UNIVERSITÉ D'ALGER

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE D'ALGER

ANNÉE 1954 - N° 1

# L'EUGLOBULINE $I_1$ DE SANDOR

## (Euglobuline gamma-lente)

## ETUDE PHYSIQUE, CHIMIQUE ET BIOLOGIQUE

*Travail du Laboratoire de Bactériologie de la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie d'Alger*

Professeur G. FABIANI

## THESE

pour le

**Doctorat de l'Université d'Alger mention Pharmacie**

Présentée et soutenue publiquement le 22 Juin 1954

par

**LABROSSE Simone**

née le 3 février 1927 à ALÈS (Dép. du GARD)

*Membres du Jury :*

MM. FABIANI, *Professeur de Bactériologie* ..... Président

MONNET, *Professeur de Pharmacie chimique et de toxicologie* ..... } Juges

LISSITSKY, *Agrégé (Chimie biologique)* .... } Juges

VARGUES, *Agrégé (Bactériologie)* ..... } Juges

Imp. IMBERT - Alger

1954

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41542708_0068

UNIVERSITÉ D'ALGER

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE D'ALGER

ANNÉE 1954 - N° 1

# L'EUGLOBULINE $I_1$ DE SANDOR

## (Euglobuline gamma-lente)

## ETUDE PHYSIQUE, CHIMIQUE ET BIOLOGIQUE

*Travail du Laboratoire de Bactériologie de la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie d'Alger*

Professeur G. FABIANI

## THESE

pour le

Doctorat de l'Université d'Alger mention Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement le 22 Juin 1954

par

**LABROSSE Simone**

née le 3 février 1927 à ALÈS (Dép. du GARD)

*Membres du Jury :*

| | | |
|---|---|---|
| MM. FABIANI, *Professeur de Bactériologie* ..... | | Président |
| MONNET, *Professeur de Pharmacie chimique et de toxicologie* ..... | } | Juges |
| LISSITSKY, *Agrégé (Chimie biologique)* .... | } | Juges |
| VARGUES, *Agrégé (Bactériologie)* ..... | } | Juges |

Imp. IMBERT - Alger

# FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE D'ALGER

| | |
|---|---|
| Doyen | MM. SARROUY (O. ✻, ⚷, ⚸, I. ☤, S.O.) |
| Doyens honoraires | LEBLANC (✻, ⚸ I. ☤) |
| | LAFFONT (C. ✻, ⚸, I. ☤, O.S.). |
| | LEBON (C. ✻, ⚸ I. ☤). |
| Assesseur | ROQUES (I. ☤). |

## PROFESSEURS

| | |
|---|---|
| Clinique médicale | MM. AUBRY (C. ✻, ⚸, I. ☤, O.S.). |
| Clinique des maladies infectieuses | BENHAMOU (C. ✻, ⚸, I. ☤, O.S.) |
| Histologie et Embryologie | KEHL (✻, I. ☤). |
| Chimie biologique et médicale | GRANGAUD (I. ☤). |
| Matière médicale | FOURMENT (O. ✻, I. ☤, M.A.). |
| Clinique obstétricale et gynécologique | LAFFONT (C. ✻, ⚸, I. ☤, O.S.). |
| Clinique thérapeutique médicale | LEBON (C ✻, ⚸, I. ☤). |
| Physiologie | MALMEJAC (✻, I. ☤). |
| Anatomie pathologique et oncologie humaine et comparée | MONTPELLIER (✻, I. ☤). |
| Physique médicale | PORTES (O. ✻, ⚸, I. ☤). |
| Clinique de dermato-syphiligraphie | HADIDA (⚸, A. ☤). |
| Anatomie | De RIBET (O. ✻, ⚸, I. ☤). |
| Clinique médicale et hygiène infantile | SARROUY (O. ✻, ⚷, ⚸, I. ☤, O.S.) |
| Clinique ophtalmologique et ophtamologie intertropicale | LARMANDE. |
| Chimie générale pharmaceutique | N... |
| Clinique chirurgicale | DUBOUCHER (✻, I. ☤). |
| Thérapeutique chirurgicale et chirurgie expérimentale | GOINARD (I. ☤). |
| Hygiène et Clinique des maladies des pays chauds | LACROIX (✻, ⚸, I. ☤, O.S.). |
| Hydrologie et Climatologie | GIBERTON (✻, I. ☤). |
| Pathologie générale et médicale | RAYNAUD R. (⚸, A. ☤). |
| Clinique chirurgicale infantile et orthopédie | LOMBARD (✻, ⚸, I. ☤). |
| Pharmacie chimique et toxicologie | MONNET (I. ☤). |
| Clinique de neuro-psychiatrie | MANCEAUX (✻, ⚸, A. ☤). |
| Parasitologie et zoologie médicale | MANDOUL (A. ☤). |
| Médecine légale et médecine du travail | THIODET (✻, ⚸, I. ☤. |
| Bactériologie | FABIANI (A. ☤). |
| Clinique urologique | SABADINI (⚸, I. ☤). |
| Botanique | ROQUES (I. ☤). |
| Clinique d'oto-rhino-laryngologie | GIRAUD (✻). |
| Clinique de phtisiologie | LEVI-VALENSI (✻, ⚸, A. ☤). |
| Pathologie chirurgicale | VERGOZ (✻, ⚸, A. ☤). |
| Accouchement et Obstétricie sociale | HOUEL (O. ✻, ⚸, I. ☤). |

## PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. CHARDON (A. ☤), Maître de conférences, Agrégé.
M. CHECHAN (I. ☤), Maître de conférences, Agrégé.
M. JAHIER (I. ☤), Agrégé.

## PROFESSEURS HONORAIRES

MM. BENOIT (✻, ⚸, I. ☤).
CABANES (✻, ⚸, I. ☤).
COURRIER (O. ✻, ⚸, I. ☤).
LEBLANC (✻, ⚸, I. ☤).
ABOULKER (✻, ⚸, I. ☤).
MM. POROT (✻, I. ☤).
RAYNAUD M. (✻, ⚸, I. ☤).
WEBER (I. ☤).
TOULANT (O. ✻, ⚸, I. ☤).

## MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

| | |
|---|---|
| Pharmacie | MM. COLLET. |
| Médecine légale et médecine de travail | MICHAUX. |

## AGREGES

| | |
|---|---|
| Accouchement | MM. EZES. |
| Médecine | BOULARD. |
| | FABREGOULE. |
| | CHOUSSAT. |
| Pédiatrie | COMBE. |
| Chirurgie | BREHANT. |
| | LAGROT. |
| | LIARAS (A. ☤). |
| Anatomie | AUBANIAC. |
| | BOURGEON (✻, A. ☤, C.S.). |
| Histologie et Embryologie | N... |
| Chimie médicale | LISSITZKY. |
| Anatomie pathologique | LAFFARGUE (A. ☤). |
| Histoire naturelle pharmaceutique | STANISLAS. |
| Oto-rhino-laryngologie | N... |
| Dermato-syphiligraphie | MARILL. |
| Bactériologie | VARGUES. |
| Chimie générale pharmaceutique | N... |
| Neuro-psychiatrie | SUTTER (✻, ⚸). |
| Ophtalmologie | N... |
| Odonto-stomatologie | PERI (✻, A. ☤, C.S.). |
| Parasitologie et zoologie médicale | JACQUEMIN. |
| Hygiène | N... |
| Urologie | DUCASSOU. |
| Electro-Radiologie | TILLIER (✻). |

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

*Je dédie cette thèse*

A MES PARENTS

*en témoignage de profonde affection et de reconnaissance*

A MA SŒUR, MON BEAU-FRERE ET MES NEVEUX

A TOUS LES MIENS

A M. le Professeur FABIANI

Professeur de Bactériologie

Médecin des Hôpitaux

*qui m'a accueillie dans son laboratoire, s'est intéressé à mon travail, m'a prodigué ses conseils et me fait le grand honneur de présider cette thèse.*

*Qu'il veuille bien trouver ici, avec ma profonde gratitude, mes sentiments de respect et de reconnaissance.*

*A mes juges,*

M. le Professeur MONNET

Professeur de Pharmacie

*qui, après m'avoir fait passer les stades succesifs de mes études universitaires, me fait l'honneur de juger ce travail. Qu'il accepte l'expression de mes sentiments de vive reconnaissance.*

M. le Professeur agrégé (Chimie biologique) LISSITSKY

*qui s'est intéressé à ce travail, a contribué à l'étude chimique et a bien voulu accepter de juger cette thèse. Qu'il en soit remercié.*

M. le Professeur agrégé (Bactériologie) VARGUES

*qui m'a proposé le sujet de cette thèse et en qui j'ai trouvé tout au long de ces recherches aide, conseil et exemple.*

*Je n'oublierai pas cette année de recherches faites sous sa direction. Je lui exprime ici toute ma gratitude et mes sincères remerciements.*

A M. Yves COLINET

Pharmacien

mon maître de stage

*Qu'il veuille bien trouver ici, avec ma profonde reconnaissance, l'expression de mes sentiments d'amitié les plus sincères.*

A M. le Docteur GRUNY

*A tous mes amis du Laboratoire de Bactériologie :*

Mme A. Verain

Mlles J. Orfila

L. Kouadri

N. Faivre

M. S. Hadjerès

*avec mes sentiments de vive sympathie.*

# PLAN - TABLE DES MATIERES


pages

INTRODUCTION. — Définition de l'Euglobuline $I_1$ ..... 11

CHAPITRE I. — Techniques et Matériel d'étude ..... 17
Préparation de l'Euglobuline $I_1$ ..... 17
Dosage de l'Euglobuline $I_1$ ..... 19
Préparation des sérums privés d'Euglobuline $I_1$ ..... 20
Matériel d'étude ..... 21

CHAPITRE II. — Propriétés physiques de l'Euglobuline $I_1$ 25
Point isoélectrique ..... 25
Solubilité en présence de sels ..... 28
Vitesse électrophorétique ..... 33
Stabilité de l'Euglobuline $I_1$ vis-à-vis de la température 37

CHAPITRE III. — Propriétés chimiques de l'Euglobuline $I_1$ 41
Taux de l'Euglobuline $I_1$ ..... 41
Teneur en lipides ..... 41
Teneur en cholestérol ..... 42
Teneur en glucides ..... 43
Etude de la méthionine, constituant de l'Euglobuline $I_1$ 44

CHAPITRE IV. — Propriétés biologiques de l'Euglobuline $I_1$ 47
A) Euglobuline $I_1$ et cryoglobulines ..... 47
B) Euglobuline $I_1$ et immunologie non spécifique ..... 51
— Euglobuline $I_1$ et agglutinines froides ..... 51
— Euglobuline $I_1$ et pouvoir anticomplémentaire . 60
— Euglobuline $I_1$ et dosage de l'alexine ..... 67
C) Euglobuline $I_1$ et anticorps spécifiques ..... 81
D) Euglobuline $I_1$ et réactions sériques non spécifiques 83

CHAPITRE V. — Physio-pathologie de l'Euglobuline $I_1$ .... 87
Caractères physiologiques de l'Euglobuline $I_1$ ..... 87
Origine de l'Euglobuline $I_1$ ..... 88
Variations physio-pathologiques du taux de l'Eu $I_1$ .... 90
Rôle physio-pathologique de l'Euglobuline $I_1$ ..... 91

CHAPITRE VI. — Globulines proches de l'Euglobuline $I_1$ 93

CONCLUSION ..... 97

# Introduction

## DÉFINITION DE L'EUGLOBULINE $I_1$

Depuis 1946, G. Sandor étudie, à l'Institut Pasteur de Paris, le système euglobulinique des sérums humains et animaux, c'est-à-dire la fraction globulinique la moins soluble. Sandor, en effet, reprenant les travaux des immunologistes (Felton et Reiner [1]) constate l'importance de la notion de solubilité dans la physiologie des anticorps : alors que les anticorps antitoxiques (antitoxines diphtériques, tétaniques...) sont hydrosolubles, les anticorps antibactériens (agglutinines antipesteuses du sérum de cheval, agglutinine anti-eberthienne des typhoïdiques) sont insolubles dans l'eau distillée. Par conséquent, il devient nécessaire de réhabiliter l'ancienne classification des globulines sériques qui distingue les « euglobulines » ou fraction insoluble dans l'eau et les « pseudoglobulines » qui sont solubles dans l'eau distillée.

Sandor remarque ensuite que la notion de solubilité n'est pas seulement fonction de la présence ou de l'absence d'électrolytes ; en effet, quand on dialyse un sérum contre de l'eau distillée et qu'on écarte le précipité formé, il est possible d'obtenir de nouvelles quantités d'euglobulines en acidifiant le dialysat. La notion de pH intervient donc : le sérum dialysé et acidifié progressivement, par paliers, fournit un certain nombre de précipités euglobuliniques. Ces précipités ne sont pas identiques les uns aux autres ; étudiés un à un, ils diffèrent par leurs propriétés : leur point isoélectrique couvre une bande de pH comprise entre pH 7,2 et 5,5, leur composition chimique (teneur en lipides liés) varie d'un préci-

pité à l'autre, et surtout leurs propriétés immunologiques sont différentes. En se basant sur la notion de solubilité, Sandor (2) est amené à distinguer trois fractions euglobuliniques principales, les euglobulines I, II et III.

La fraction Euglobulinique I comprend les euglobulines qui précipitent entre pH 7,5 et 6,6 quand on raréfie les électrolytes par dialyse ou par dilution du sérum. C'est-à-dire que cette fraction Euglobuline I groupe les euglobulines de point isoélectrique (pHi) élevé, les autres groupes II et III ont leur pHi situé dans une région plus acide.

Parmi les euglobulines I, l'une a des caractères bien particuliers, c'est l'Euglobuline recueillie par simple dialyse du sérum à pH 7,5. Le caractère le plus frappant de cette fraction est le suivant : si on dialyse un sérum de sujet sain contre de l'eau tamponnée à pH 7,5, on obtient un précipité insignifiant, négligeable ; au contraire, certains sérums pathologiques fournissent, dans les mêmes conditions, des précipités massifs, considérables. Cette « euglobuline de dialyse à pH 7,5 » se présentant donc à priori comme une protéine pathologique, doit être distinguée des autres euglobulines du groupe I. Sandor (3) lui donne le nom d'Euglobuline $I_1$.

Sandor étudie les principales propriétés de cette Euglobuline et chacune de ses propriétés montre le caractère anormal de cette fraction sérique :

*a*) Le point isoélectrique de l'Euglobuline $I_1$ est très élevé, et se situe à pH 7,2 ; en réalité, l'Euglobuline présente une zone d'insolubilité qui s'étend entre pH 8,2 et pH 6,2.

*b*) L'étude électrophorétique de cette Euglobuline $I_1$ montre d'abord qu'il s'agit d'une protéine pure ; le tracé électrophorétique ne présente qu'un seul pic, très aigu, bien différent du dome classique des globulines sériques. La vitesse de l'Euglobuline $I_1$ dans le champ électrique est très lente, deux fois plus lente que la vitesse des $\gamma$ -globulines banales. L'Euglobuline $I_1$ est donc une $\gamma$ -euglobuline lente.

*c*) L'analyse chimique montre que l'Euglobuline $I_1$ est une protéine pure, sa charge en lipides et en sucres liés est négligeable.

*d*) L'Euglobuline $I_1$ présente des propriétés immunologiques importantes ; elle est en effet le support des anticorps agglutinant et précipitant dans les sérums d'Homme et de Cheval.

*e*) L'Euglobuline $I_1$, protéine anormale, se trouve dans des états pathologiques caractérisés principalement par une hyperplasie du système réticulo-endothélial et particulièrement du système macrophagique. Sandor (4) lui assigne donc une origine macrophagique « l'Euglobuline $I_1$ n'est rien autre que le protoplasme des macrophages désagrégé par clasmatocytose ».

Connaissant tous ces caractères, il devient possible de donner une définition assez stricte de cette fraction euglobulinique.

## Définition de l'Euglobuline $I_1$ d'après Sandor

L'Euglobuline $I_1$ de Sandor est une globuline peu soluble dans l'eau distillée, obtenue par dialyse du sérum à pH 7,5. Son point isoélectrique est de pH 7,2. Sa vitesse électrophorétique est celle d'une $\gamma$ -globuline lente. Elle est le support des agglutinines-précipitines. Enfin, cette Euglobuline n'existe que dans certains sérums pathologiques. Elle provient du protoplasme des macrophages.

## Objet de notre travail

La définition de l'Euglobuline $I_1$ montre l'importance des travaux de Sandor au sujet de cette protéine. Ces travaux furent confirmés par les diverses études faites sur la « fiche réticulo-endothéliale » puisque dans ce test, la fraction $I_1$ n'était retrouvée en quantité appréciable que dans certains sérums pathologiques. Cependant, les études de Sandor n'épuisaient pas l'étude des propriétés de l'Euglobuline $I_1$.

En effet, Sandor s'était attaché à certains caractères spécifiques des sérums riches en Euglobuline $I_1$, en particulier aux propriétés spécifiques anticorps. Or, les propriétés non spécifiques de tels sérums sont aussi remarquables. En 1952, R. Vargues (4), étudiant le sérum de cheval antipesteux, très riche en Euglobuline $I_1$, montrait que ce sérum fournissait des réponses fortement positives avec les tests de Sia, Mac Lagan, Kunkel, Vernes, Gros, Wurhmann-Wunderly et de Hanger et que la positivité de ces tests tenait à la présence de la fraction anormale $I_1$. D'autre part, le même sérum antipesteux se comportait comme une pan-agglutinine, agglutinant à froid les hématies de cheval et aussi des suspensions bactériennes diverses : *Salmonella, Brucella, Proteus.*

Reprenant ces études des propriétés non spécifiques de l'Euglobuline $I_1$, R. Vargues avec L. Schembri (5) étudiaient, en 1953, le rôle de l'Euglobuline $I_1$ dans les « réactions sériques non spécifiques » (dites aussi réactions de labilité colloïdale, labilité plasmatique, et souvent considérées comme des réactions d'insuffisance hépatique).

Pour notre part, nous avons étudié au Laboratoire de Bactériologie du Professeur Fabiani, sous la direction de R. Vargues, certaines propriétés de l'Euglobuline $I_1$. A nos recherches personnelles, qui font l'objet d'une description détaillée dans ce travail, nous avons ajouté les connaissances déjà acquises sur l'Euglobuline $I_1$, de façon à présenter un tableau assez complet des divers aspects de cette protéine. Dans les chapitres ultérieurs, nous exposerons les propriétés physiques, chimiques et biologiques de l'Euglobuline $I_1$ puis nous essaierons de donner un aperçu de la physio-pathologie de cette globuline.

**Remarque importante.**

Au cours de cette étude, nous désignerons sous le nom d'Euglobuline $I_1$, les protéines sériques précipitant à pH 7,4 dans les solutions de faible force ionique. Nous intéressant surtout aux propriétés biologiques de l'Euglo-

buline $I_1$ ainsi préparée, nous ne discuterons pas de la pureté chimique de telles préparations, et nous nous contenterons de quelques preuves d'homogénéité des protéines ainsi obtenues (critère électrophorétique, point isoélectrique, composition chimique).

Exceptionnellement, nous distinguerons parfois plusieurs fractions dans l'Euglobuline $I_1$. En effet, SANDOR a décrit plusieurs sous-fractions de l'Euglobuline $I_1$, selon la solubilité dans l'eau et selon la précipitabilité par le sulfate d'ammonium (2). L'étude approfondie de ces sous-fractions n'entre pas dans le cadre de notre travail.

# CHAPITRE I

## TECHNIQUES ET MATÉRIEL

Au cours de notre travail, nous avons mis en œuvre des techniques très variées : électrophorèse, précipitation des protéines par les sels, dosages chimiques, épreuves immunologiques (agglutination, dosage de complément, dosage du pouvoir anticomplémentaire...). Les techniques utilisées dans un but spécial de recherche seront exposées plus loin. Dans ce chapitre, nous voulons donner les modes de préparation et de dosage des euglobulines et particulièrement de l'Euglobuline $I_1$.

### Préparation de l'Euglobuline $I_1$

L'Euglobuline $I_1$, fraction globulinique insoluble dans l'eau distillée, est préparée de deux manières, soit par dialyse contre une solution tampon, soit par dilution dans une solution tampon.

#### Précipitation par dialyse.

Le sérum dont on veut extraire l'Euglobuline $I_1$, placé dans des sacs de collodion, est mis à dialyser pendant 24 heures et à 0° contre une solution tampon de pH 7,5. Après avoir expérimenté plusieurs solutions, R. Vargues (6-7), A. Guiraud (8) et R. Lhéritier (9) ont donné la préférence à la solution tampon de Britton et Robinson utilisée pour la fiche réticulo-endhotéliale. Cette solution est un mélange de pH 1,81, d'acides phosphorique, acétique, borique, chaque corps étant dilué au 1/25 de sa molarité (Acide phosphorique pur 3,92 g ; Acide acétique pur 2,40 g ; Acide borique pur 2,48 g ; Eau dis-

tillée 1.000 cm3). Ce tampon, au moment de l'emploi, est dilué au 1/8 dans l'eau distillée, puis on obtient le pH désiré par addition de soude N/20 (Solution initiale de Britton et Robinson 100 cm3 ; Eau distillée 700 cm3 ; Soude N/20 220 cm3). Cette solution est diluée à nouveau au quart dans l'eau distillée. Elle a un pH de 7,5. C'est contre cette solution que se fait la dialyse. Après 24 heures de contact, on sépare par centrifugation le précipité d'Euglobuline $I_1$ qui s'est formé dans le fond des sacs de collodion.

**Précipitation par dilution.**

Cette précipitation s'effectue dans de grandes éprouvettes de 1.000 cm3 dans lesquelles on place une solution-tampon qui est le tampon phosphate suivant : Phosphate monopotassique M (136 g p. 1.000), 4 cm3 ; Soude N, 3 cm3 ; Eau distillée, 600 cm3. Le pH de cette solution est de 7,5. Dans ce tampon, on ajoute 30 cm3 du sérum dont on veut extraire l'Euglobuline $I_1$. Les éprouvettes sont portées à $+4°$ pendant 16 heures. On décante ensuite par aspiration du liquide surnageant le précipité. Celui-ci est recueilli par centrifugation.

**Mise en solution de l'Euglobuline $I_1$.**

La mise en solution des précipités formés dans les deux méthodes est assez délicate. En effet, nous verrons que l'Euglobuline $I_1$ est particulièrement insoluble. Pour obtenir une dissolution complète, il est nécessaire d'utiliser de l'eau physiologique légèrement alcaline. Dans tous les cas, nous avons utilisé de l'eau physiologique (9 p. 1.000 en ClNa) bicarbonatée à 1 p. 1.000. Cette solution est ajoutée au culot de centrifugation recueilli précédemment. La dissolution est obtenue par agitation prolongée avec une baguette de verre. La dissolution est facilitée par chauffage au bain-marie à 37°.

Les solutions ainsi obtenues sont translucides mais fortement opalescentes.

**Identité des deux méthodes.**

Nous avons préparé de l'Euglobuline $I_1$ par ces deux méthodes et les mêmes expériences faites sur cette protéine préparée différemment nous ont donné les mêmes résultats. La préparation par dilution est utilisable lorsqu'on dispose d'assez grandes quantités de sérum (sérum de cheval antipesteux). La préparation par dialyse est appréciable dans les cas où l'on ne dispose que de petites quantités de sérum (sérums humains pathologiques).

## Dosage de l'Euglobuline $I_1$

**Dosage de l'Euglobuline $I_1$ dans les préparations pures.**

Pour ce dosage, nous avons utilisé le réactif cuproalcalin de biuret ; pour cela, on met 1 cm3 d'une solution d'Euglobuline $I_1$ dans de l'eau physiologique bicarbonatée et 4 cm3 du réactif de biuret. On agite, on laisse reposer 30 minutes, on lit au colorimètre en comparant avec une solution témoin faite simultanément (1 cm3 d'eau physiologique, 4 cm3 de réactif de biuret). Une courbe d'étalonnage permet de calculer, à partir des degrés colorimétriques, la quantité d'Euglobuline $I_1$ contenue dans la prise d'essai.

**Dosage de l'Euglobuline $I_1$ dans les sérums.**

Le dosage de l'Euglobuline $I_1$ dans les sérums est donné par le premier point de la fiche réticulo-endothéliale dont nous allons exposer la technique puisque ce test a été utilisé pour nos recherches.

La fiche réticulo-endothéliale de Sandqr, modifiée par R. Vargues (6 - 7), a été l'objet des travaux de ses élèves R. Lhéritier (9) et L. Schembri (10). On utilise dans cette réaction le tampon de Britton et Robinson dilué au 1/8 dans de l'eau distillée. Dans huit flacons, on répartit 40 cm3 de ce tampon dilué et l'on ajoute dans chacun des flacons de la soude N/20 en quantité décrois-

sante : 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 cm3. Pour établir la fiche, on répartit 2 cm3 de chacun des huit liquides dans huit tubes à hémolyse et dans chacun d'eux on ajoute un volume de 0,05 cm3 du sérum à étudier. On agite. On laisse au repos 1/2 heure. On détermine ensuite la densité optique et le pH de chaque tube. On trace la courbe des variations de la densité optique en fonction des pH. Cette courbe est comparée à une courbe de référence fournie par un sérum normal.

De cette fiche, il est possible de déduire la quantité d'Euglobuline $I_1$ existant dans le sérum, puisque le premier point de la courbe correspond à la précipitation de la fraction euglobulinique insoluble à pH 7,4, c'est-à-dire de l'Euglobuline $I_1$. De la densité optique ainsi observée, on peut déduire la quantité d'Euglobuline $I_1$ par litre de sérum : il suffit de tracer une courbe de correspondance entre les degrés Vernes et le poids du précipité formé. Nous donnons ci-dessous quelques points de cette courbe :

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 10 | degrés | Vernes | = 0,7 g | d'Euglobuline | $I_1$, | p. 1.000 |
| 20 | » | » | = 1,5 g | » | | » |
| 30 | » | » | = 2,3 g | » | | » |
| 40 | » | » | = 3 g | » | | » |
| 50 | » | » | = 4 g | » | | » |

## Préparation de sérums privés de l'Euglobuline $I_1$

De manière à montrer dans les recherches ultérieures que l'Euglobuline $I_1$ est le support d'une activité déterminée, il est nécessaire de pouvoir enlever cette protéine sans modifier les autres propriétés du sérum. Dans ce but, nous précipitons l'Euglobuline $I_1$ par dialyse dans des sacs de collodion. Quelques précautions doivent être prises pour éviter que le liquide de dialyse ne dilue le dialysat par endosmose. Pour pallier cet inconvénient, on utilise la technique décrite par Sandor, de dialyse sous pression. Le tube qui supporte le sac de dialyse est bouché à l'aide d'un bouchon de caoutchouc

perforé ; dans la perforation passe la branche inférieure d'un tube manométrique. Une petite quantité de mercure dans le tube manométrique suffit à maintenir une pression suffisante pour éviter une dilution trop importante du sérum à dialyser. La dialyse est poursuivie pendant 24 à 48 heures ; le liquide de dialyse est privé, par centrifugation, de l'Euglobuline $I_1$ précipitée ; il est ramené à l'isotonie par addition d'eau hypersalée à 10 p. 100.

## MATÉRIEL D'ÉTUDE

L'Euglobuline $I_1$ est une protéine anormale, par conséquent, nous avons employé des sérums pathologiques d'origines animale et humaine.

### Sérums animaux.

Nous avons utilisé de grandes quantités de sérum de cheval hyper-immunisé contre la peste (500 cm3). Ce sérum est préparé à l'Institut Pasteur de Paris par inoculation intraveineuse de culture de *Pasteurella pestis*. Le sérum recueilli stérilement ne doit être ni chauffé, ni formolé pour convenir à la préparation de l'Euglobuline $I_1$. Les sérums des chevaux, ainsi préparés, contiennent jusqu'à 12 g d'Euglobuline $I_1$ par litre. Nous avons aussi utilisé deux sérums de chiens atteints de kala azar ; ces sérums nous ont été fournis par l'Institut Pasteur d'Algérie.

### Sérums humains.

La plus grande partie de nos recherches a été effectuée sur des sérums de malades hospitalisés à l'Hôpital de Mustapha. Nous avons étudié :

64 sérums de malades atteints de cirrhose du foie ;
10 » » malades présentant une splénomégalie chronique ;
6 » » malades paludéens ;

1 » » malade atteint de maladie du sommeil (Hôpital Maillot) ;

2 » » malades atteints d'endocardite bactérienne ;

60 » » malades atteints d'affections diverses.

Certains de ces malades nous ont fourni des quantités suffisantes de sang pour pouvoir rechercher sur un même sérum l'ensemble des propriétés étudiées dans ce travail.

**Caractéristiques des sérums riches en Euglobuline $I_1$.**

Les sérums convenables à nos recherches présentent une fiche réticulo-endothéliale caractéristique. Le point de départ de la courbe à pH 7,4 est toujours haut situé dans l'échelle des ordonnées (ordonnée à pH 7,4 supérieure à 10 degrés Vernes). Entre les abcisses de pH 7,4 et 6,5, la courbe est nettement au-dessus du tracé de référence. L'abcisse du sommet se situe au-dessus de pH 5,8, elle atteint souvent 6,2 ou 6,3 (déviation alcaline de la fiche). Au-dessous de pH 5,8, la courbe peut affecter deux aspects : ou bien elle se superpose au tracé de référence (les α -euglobulines sont normales) ou bien elle se situe au-dessous de ce tracé (les α -euglobulines sont diminuées).

Nous donnons dans un tableau l'allure générale des fiches réticulo-endothéliales typiques de paludisme, de maladie du sommeil et de cirrhose hépatique, et la fiche réticulo-endothéliale du sérum de cheval antipesteux.

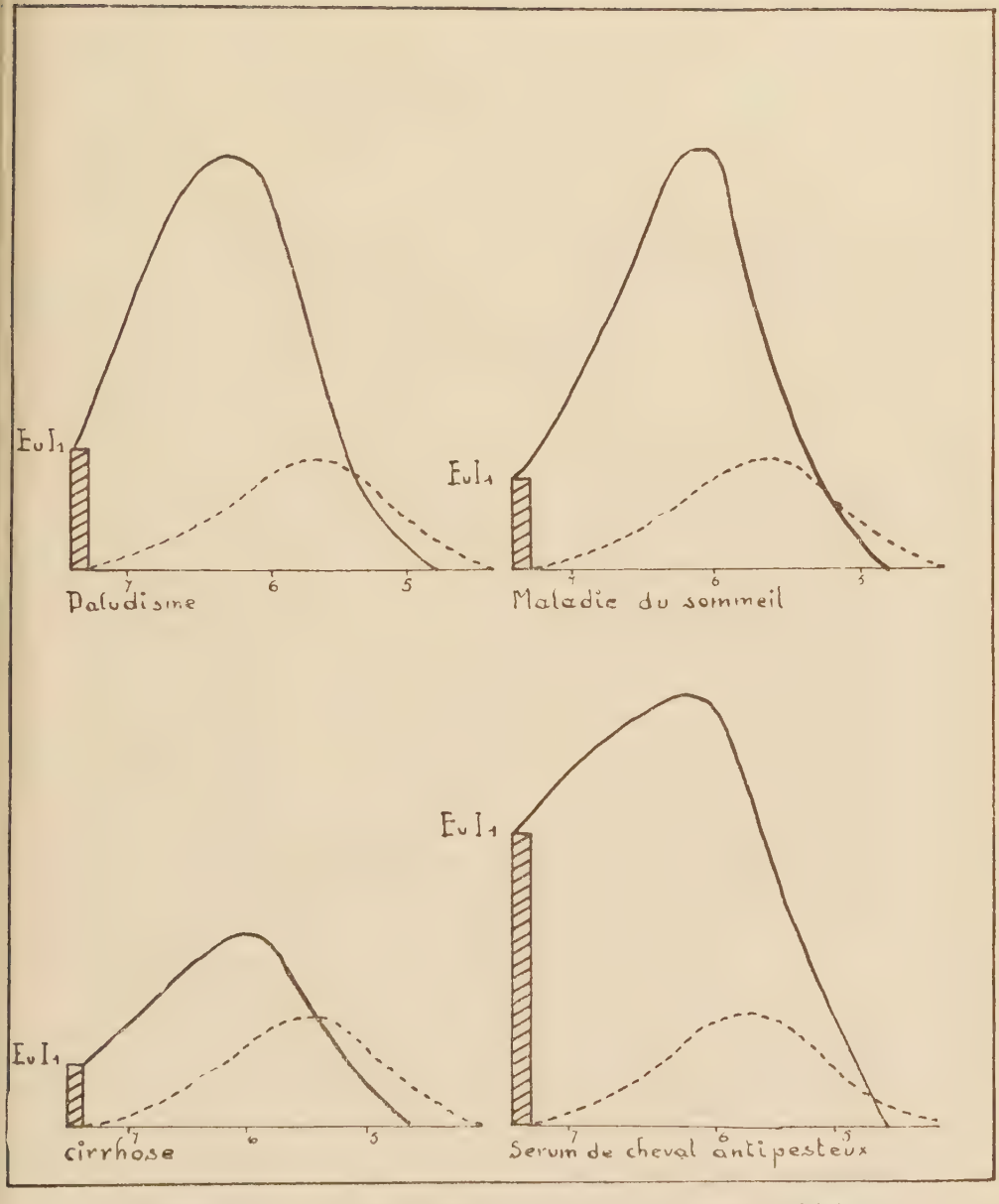



FIGURE N° 1 : Divers types de fiche réticulo-endothéliale.

# CHAPITRE II

## ÉTUDE PHYSIQUE DE L'EUGLOBULINE $I_1$

### Point isoélectrique

**Technique.**

Nous avons déterminé la solubilité de l'Euglobuline $I_1$ extraite du sérum de cheval antipesteux, par la méthode de solubilité en fonction du pH. Pour cela, nous avons utilisé le tampon de Britton et Robinson dilué au 1/8. Nous avons mis 10 cm3 de ce tampon dilué dans 14 tubes à essais et nous avons ajouté dans chacun des tubes de la soude N/20 en quantité décroissante : 4 - 3,75 - 3,50 - 3,25 - 3,0 - 2,75 - 2,50 - 2,25 - 2,0 - 1,75 - 1,50 - 1,25 - 1,0 - 0,75 cm3. Puis nous avons réparti 2 cm3 de chacune des solutions obtenues dans 14 tubes à hemolyse. Dans chacun de ceux-ci, nous avons ajouté 0,05 cm3 de solution d'Euglobuline $I_1$. Après agitation et repos 30 minutes, nous avons déterminé le degré d'opacité à l'aide d'un photomètre de Vernes, Bricq et Yvon. (L'opacité sera donc donnée en degrés Vernes.)

L'opacité déterminée, nous avons pris le pH de chaque tube et nous avons obtenu l'échelle des pH suivants : 9,2 - 8,8 - 8,5 - 8,1 - 7,7 - 7,3 - 7 - 6,6 - 6,2 - 5,8 - 5,2 - 4,9 - 4,5 - 4.

Ces expériences ont été faites avec des solutions d'Euglobuline $I_1$ contenant 30,3 - 15,2 - 7,6 - 3,8 - 1,9 g de cette protéine par litre.

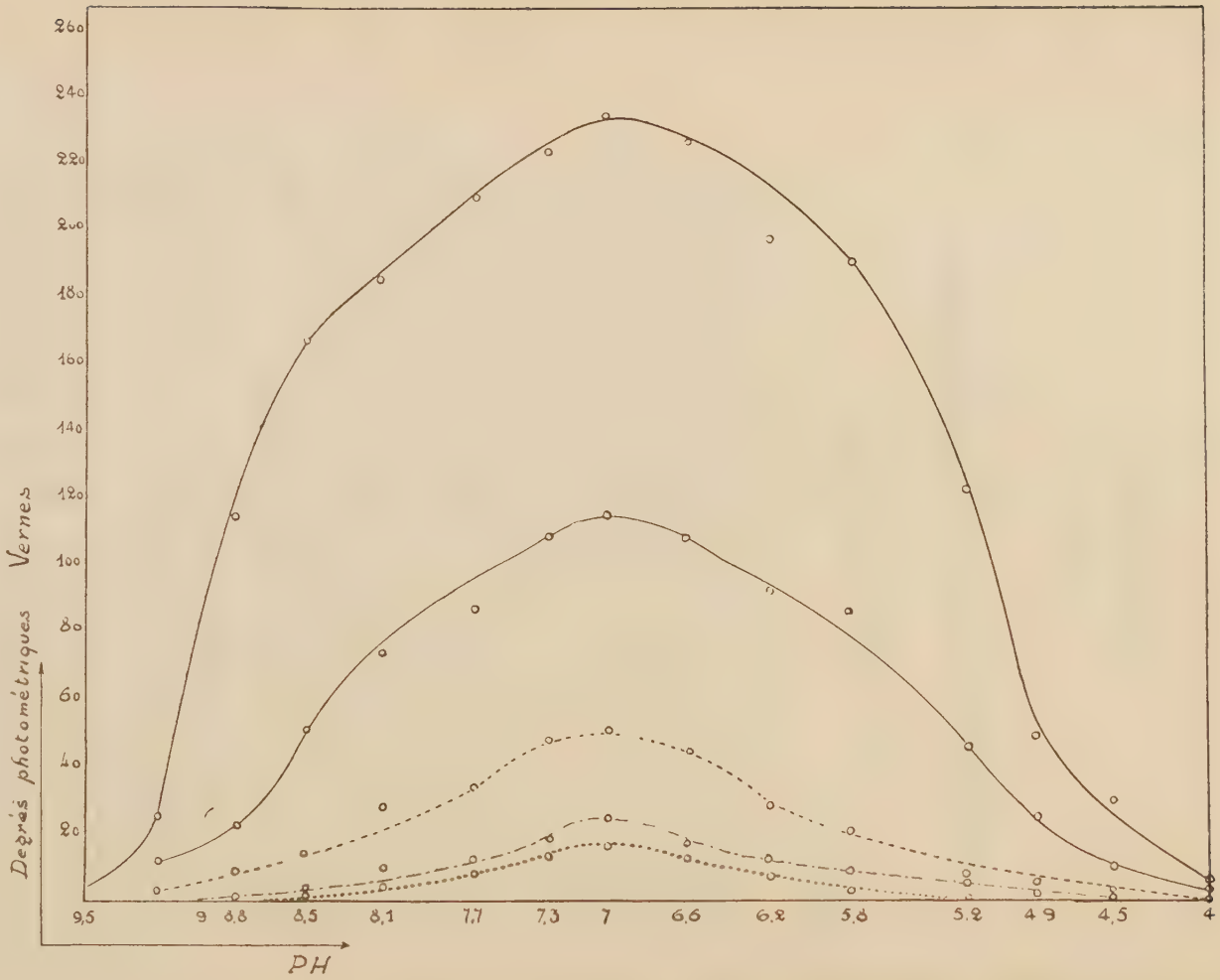



FIGURE N° 2 : Détermination du pHi.

**Résultats.**

Les résultats sont donnés dans le tableau suivant et sont transcrits dans la courbe 2 :

| Concentration | Valeur des pH | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 9,2 | 8,8 | 8,5 | 8,1 | 7,7 | 7,3 | 7 | 6,6 | 6,2 | 5,8 | 5,2 | 4,9 | 4,5 | 4 |
| ,3 g d'Eu $I_1$/litre | 25 | 113 | 156 | 185 | 210 | 223 | 235 | 226 | 219 | 190 | 121 | 50 | 30 | 6 |
| ,2 g d'Eu $I_1$/litre | 10 | 21 | 51 | 74 | 85 | 108 | 115 | 108 | 93 | 84 | 44 | 23 | 10 | 4 |
| ,6 g d'Eu $I_1$/litre | 2 | 8 | 14 | 27 | 33 | 47 | 50 | 44 | 28 | 20 | 8 | 5 | 3 | 0 |
| ,8 g d'Eu $I_1$/litre | 0 | 0 | 3 | 10 | 13 | 19 | 22 | 18 | 12 | 8 | 5 | 1 | 0 | 0 |
| ,9 g d'Eu $I_1$/litre | 0 | 0 | 2 | 5 | 8 | 12 | 15 | 12 | 6 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |

D'après ce tableau de résultats et la courbe, nous voyons que l'insolubilité de l'Euglobuline $I_1$ s'étend entre les pH 8,2 et 5,8 avec un maximum à pH 7. pH 7 représente donc le point isoélectrique de l'Euglobuline $I_1$. Notons que ce minimum de solubilité est indépendant de la concentration en protéine ; il se retrouve avec toutes les concentrations employées.

**Remarques.**

Ces dosages confirment donc les études faites par G. Sandor sur la solubilité de l'Euglobuline $I_1$ en fonction du pH. En effet, cet auteur a décrit la même zone isoélectrique comprise entre pH 8 et pH 6. Il est intéressant de souligner que notre technique diffère de celle de G. Sandor et que cependant nous obtenons les mêmes résultats.

La courbe de solubilité de l'Euglobuline $I_1$ en fonction du pH diffère nettement des courbes de solubilité des autres euglobulines. En effet, l'Euglobuline $I_1$ est la seule globuline qui présente une telle zone d'insolubilité. Les autres euglobulines donnent des courbes à sommet très net dans lesquelles le minimum de solubilité correspond à un seul pH bien déterminé. Par exemple, l'Euglobuline II a un pHi égal à 6 (Sandor [11]) et l'Euglobuline III à 5,5 (Vargues [12]).

## Solubilité en présence de sels

Nous avons essayé de déterminer la solubilité de l'Euglobuline $I_1$ par rapport aux sels neutres : chlorure-sulfate-phosphate.

### Solubilité en fonction de la concentration en chlorure de sodium.

Nous avons préparé une solution de chlorure de sodium à 10 p. 100. Le pH de cette solution est de 6,3. Nous avons ajouté des quantités croissantes de cette eau hypersalée à l'eau tamponnée de pH 7,3 suivante : tampon Britton et Robinson 25 cm3 ; eau distillée 175 cm3 ; soude N/20 50 cm3. Puis nous avons préparé les solutions suivantes :

| Numéro des tubes | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Eau tamponnée | 10 | 9,9 | 9,8 | 9,7 | 9,6 | 9,5 | 9,4 | 9,3 | 9,2 | 9,1 | 9 |
| Solution NaCl . | 0 | 0,1 | 0,2 | 0,3 | 0,4 | 0,5 | 0,6 | 0,7 | 0,8 | 0,9 | 1 |
| NaCl p. 100 .. | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |

Nous avons réparti 2 cm3 de chacune de ces 11 solutions dans 11 tubes à hemolyse et dans chacun d'eux nous avons ajouté 0,05 cm3 de solution d'Euglobuline $I_1$ en eau physiologique bicarbonatée, contenant 30,3 g de cette protéine par litre. Nous avons laissé au repos 1/2 heure et avons déterminé l'opacité au photomètre de Vernes.

### Résultats obtenus.

| NaCl p. 100 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Degrés Vernes | 66 | 60 | 56 | 47 | 38 | 23 | 15 | 15 | 15 | 15 | 14 |

L'opacité correspondant à l'insolubilité, nous voyons d'après ce tableau et la courbe N° 3 que la solubilité de l'Euglobuline $I_1$ augmente à mesure qu'aumente la teneur en chlorure de sodium, jusqu'à une concentration de 6 p. 100 ; puis à partir de cette concentration, nous obtenons un plateau, c'est-à-dire que la solubilité n'est pas modifiée par un apport supplémentaire de chlorure de sodium.

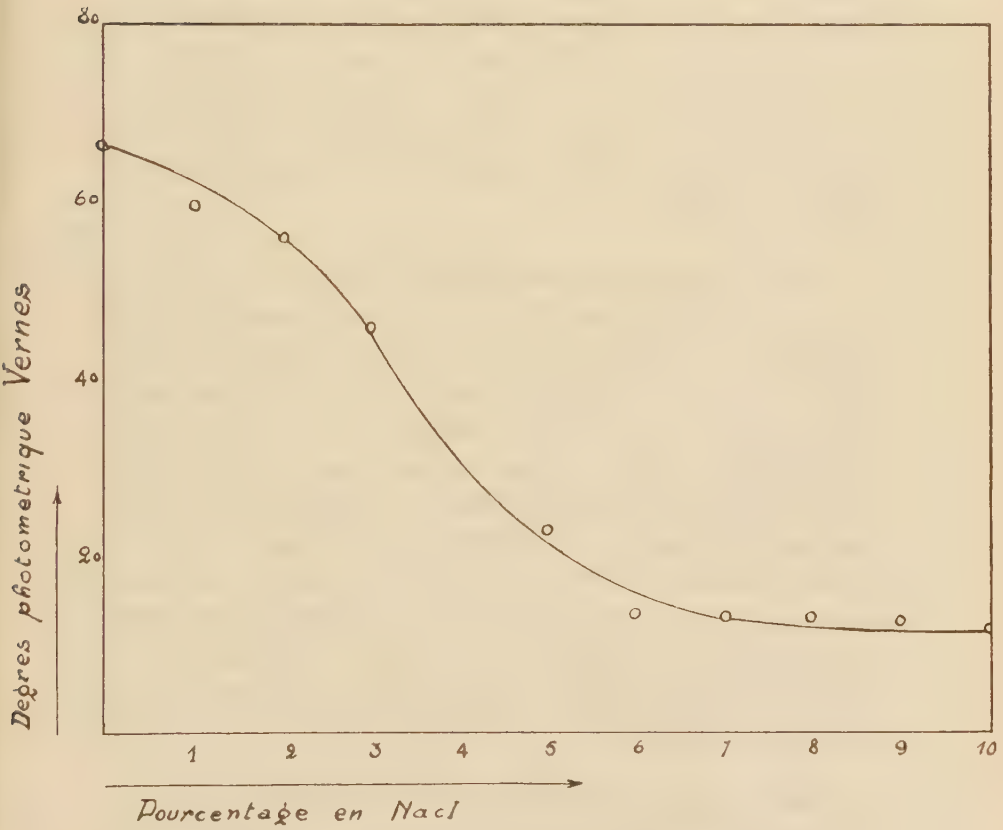



FIGURE N° 3 : Solubilité de Eu $I_1$ en fonction de ClNa.

**Solubilité de l'Euglobuline $I_1$ en fonction de la concentration en sulfate d'ammonium.**

Pour préparer la solution saturée de sulfate d'ammonium, on met à chauffer de l'eau distillée, dans une capsule de porcelaine de grande capacité. On ajoute peu à peu du sulfate d'ammonium pur jusqu'à saturation à chaud (formation d'une pellicule cristalline à la surface du liquide). A ce moment, on ajoute la quantité nécessaire d'ammoniaque pour alcaliniser la solution. Cette solution a un pH de 7,8.

Nous avons préparé de l'Euglobuline $I_1$ selon la méthode déjà décrite par dilution, et nous avons recueilli une partie du liquide surnageant le précipité : c'est ce que nous appellerons le « surnageant ». Le précipité d'Euglobuline $I_1$ recueilli est dissous dans de l'eau physiologique bicarbonatée. Nous l'avons laissé reposer. Nous avons obtenu ainsi deux parties : un liquide surnageant contenant la fraction d'Euglobuline $I_1$ la plus soluble et un culot contenant la fraction d'Euglobuline $I_1$ la moins soluble. C'est sur ces trois substances, surnageant, fraction soluble et fraction moins soluble d'Euglobuline $I_1$ qu'ont porté nos essais de solubilité dans le sulfate d'ammonium.

Nous avons mis dans trois tubes à essais, 3 cm3 de chacune des trois fractions décrites ci-dessus ;, puis dans chacun des tubes nous avons ajouté des quantités croissantes de solution saturée de sulfate d'ammonium et nous avons observé la formation de précipités dans

les tubes. L'expérience et ses résultats sont décrits dans le tableau suivant :

| Quanité de sulfate d'ammonium en solution saturée | Matériel étudié | | |
|---|---|---|---|
| | 3 cm3 d'Eu $I_1$ soluble | 3 cm3 d'Eu $I_1$ moins soluble | 3 cm3 de surnageant |
| 0,8 cm3 Concentration = 21 p, 100 | 0 | 0 | 0 |
| + 0,2 cm3 C = 25 p. 100 | + — | + Début de précipitation | 0 |
| + 0,2 cm3 C = 28 p. 100 | + | ++ | 0 |
| + 0,3 cm3 C = 30 p. 100 | ++ Début de floculation | Floculation | 0 |
| + 0,2 cm3 C = 33 p. 100 | +++ Floculation | » | 0 |
| + 0,2 cm3 C = 36 p. 100 | » | » | + — |
| + 0,3 cm3 C = 40 p. 100 | » | » | ++ |
| + 0,3 cm3 C = 43 p. 100 | » | » | Début de floculation |

*Commentaires :* L'Euglobuline $I_1$ précipite dans des solutions contenant 25 p. 100 de sulfate d'ammonium à saturation. Le schéma nous montre que :

— la fraction la moins soluble d'Euglobuline $I_1$ commence à précipiter à partir de 25 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium (de pH 7,6 - 7,8). La floculation est totale pour 30 p. 100 de saturation.

— la fraction principale d'Euglobuline $I_1$ commence à précipiter pour 25 p. 100 et flocule à 33 p. 100.

— quant au liquide surnageant, contenant l'albumine, les globulines $\alpha$ et $\beta$ et les $\gamma$ pseudo-globulines, il ne commence à précipiter qu'à 36 p. 100 et ne flocule qu'à 43 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium.

**Solubilité de l'Euglobuline $I_1$ dans le mélange phosphate de Derrien.**

Le mélange phosphate de Derien est préparé comme suit : dans un erlenmeyer de 250 cm3, on repère un volume de 200 cm3, on y verse 152 g de phosphate dipotassique et on ajoute de l'eau distillée jusqu'à un volume inférieur à 200 cm3. Dans un deuxième erlenmeyer, on repère un volume de 300 cm3 et on verse 119 g de phosphate monopotassique, puis de l'eau distillée jusqu'à 300 cm3. On porte les deux fioles à l'ébullition ; on mélange à chaud ; on laisse refroidir et on complète à 500 cm3 avec de l'eau distillée.

La solution est de molarité 3,5 M.

Nous avons fait les essais de solubilité dans ce phosphate par rapport aux molarités des solutions obtenues, avec la fraction la plus soluble d'Euglobuline $I_1$ et avec le liquide surnageant. Nous avons eu le schéma suivant :

| Phosphate de Derrien ajouté et molarité obtenue | Matériel étudié 2.6 eau physiologique bicarbonatée + 0,4 cm3 d'Eu $I_1$ fraction soluble | 3 cm3 de surnageant |
|---|---|---|
| 1 cm3 | 0 | 0 |
| + 0,5 cm3 = 1,16 M | + — | 0 |
| + 0,5 cm3 = 1,4 M | + | 0 |
| + 0,5 cm3 = 1,6 M | ++ Début de floculation | 0 |
| + 0,5 cm3 = 1,75 M | +++ Floculation | + — |
| + 0,5 cm3 = 1,8 M | ++++ Floculation | + |
| + 0,5 cm3 = 2 M | ++++ Floculation | ++ Légère floculation |

*Commentaires :* La fraction la plus soluble de l'Euglobuline $I_1$ commence à précipiter dans la solution de phosphate de Derrien pour une molarité égale à 1,4 M et flocule dans une solution de molarité 1,6 M. Le liquide surnageant le précipité d'Euglobuline $I_1$ et contenant l'albumine, les globulines α et β et les γ pseudo-globulines, commence à précipiter dans une solution de molarité 1,8 M et commence à floculer dans une solution de molarité 2 M.

## Vitesse électrophorétique

### Travaux de Sandor.

G. Sandor et S. de Mende ont étudié par électrophorèse les euglobulines en général et l'Euglobuline $I_1$ en particulier (13). Ces auteurs préparent l'Euglobuline $I_1$ par dialyse pendant quelques heures contre une solution-tampon-phosphate de Clark et Lubbs M/75 de pH 7,6 - 7,7. Puis, pendant 48 heures contre le même tampon M/150. Pour l'électrophorèse de cette protéine, G. Sandor et S. de Mende utilisent le tampon véronal de Longsworth, car la solubilité de l'Euglobuline $I_1$ à pH 7,6 - 7,7 est trop faible pour utiliser le tampon électrophorétique habituel de Clark et Lubbs contenant 0,15 M de chlorure de sodium.

*Technique :* Les auteurs ont utilisé l'appareil électrophorétique de Tiselius avec le dispositif optique de Philpot-Svensson perfectionné par Wiedemann. Les gradients de potentiel dans la cellule analytique sont compris entre 4 et 5 volts par centimètre. Le sérum est placé dans un champ électrique et les protéines migrent plus ou moins rapidement suivant leur charge. La séparation des divers constituants commence à être visible au bout d'une heure et demie mais il est nécessaire de poursuivre l'expérience pendant 4 à 5 heures pour obtenir de meilleurs diagrammes.

G. Sandorr et S. de Mende calculent les mobilités électrophorétiques selon la formule classique : $U = \frac{d.k.s.}{I.T.}$

(U = mobilité ; d = déplacement du corps dissous en centimètres ; k = conductibilité spécifique de la solution ; s = section du tube analytique en cm2 ; I = intensité du courant ; T = durée de l'expérience.)

Les mobilités sont exprimées en $cm3\ sec^{-1}volt^{-1}$. On les multiplie par $10^5$ et on les précède du signe + si la migration se fait vers l'anode et du signe — si elle se fait vers la cathode.

*Résultats :* Dans l'appareil de Tiselius, l'Euglobuline $I_1$ donne une bande unique. Cette bande est dissymétrique et s'interprète facilement si, comme ces auteurs, on admet l'existence dans l'Euglobuline $I_1$ de deux fractions de nature très proche en proportions sensiblement égales. La fraction qui précipite à 28 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium est hétérogène, son composant principal est une γ -globuline de mobilité relativement faible (0,6 à 1 x $10^{-5}$). A côté, en proportions variables (15 à 35 p. 100), on trouve une deuxième globuline dont la mobilité électrophorétique est intermédiaire entre celle des γ et des β globulines.

La bande électrophorétique de l'Euglobuline $I_1$ est diffuse comme celle des γ -globulines normales. Les fractions précipitant entre 28 et 35, 35 et 40, 40 et 50 p. 100 de saturation, sont homogènes et sont des γ -globulines lentes (0,8 x $10^{-5}$) ; alors que les globulines normales du sérum présentent des bandes diffuses, les bandes des précédentes fractions sont étroites, donc présentent une homogénéité accusée. G. Sandor conclut que l'Euglobuline $I_1$ est une γ globuline lente.

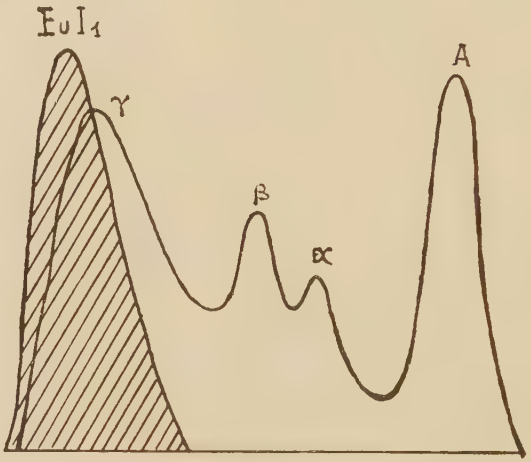
**Travaux personnels.**

*Technique :* Pour ces études électrophorétiques, nous avons utilisé un appareil à électrophorèse sur papier dans lequel nous avons substitué aux cuves électrophorétiques habituelles de cet appareil, les cuves conçues par

C. Chechan (14). L'appareil est constitué par un bac contenant deux cuves identiques dans lesquelles est mise la solution-tampon et où plongent d'un côté l'anode, de l'autre la cathode d'un système électrique. Le pont entre ces deux cuves est constitué par une bande étroite de papier Arches. Après avoir déposé le sérum sur ce papier on l'imbibe de la solution-tampon. La solution-tampon que nous avons utilisée est celle de Durrum (véronal : 1,84 g ; véronal sodique : 10,30 g ; eau distillée : 1.000 cm3). L'appareil électrophorétique fonctionne sur 110 volts pendant 3 heures. Le courant électrique allant d'un pôle à l'autre provoque la migration plus ou moins rapide des constituants du corps dont on fait l'électrophorèse, selon la charge électrique de ceux-ci. Après 3 heures, les bandes de papier à électrophorèse sont plongées dans un colorant pendant 15 à 20 minutes. Nous avons utilisé : bleu de bromophénol : 1 g ; chlorure mercurique : 65 g ; alcool à 95° : 200 cm3. Les bandes sont ensuite décolorées à l'eau courante jusqu'à ce que les parties sur lesquelles il n'y a pas eu de migration soient blanches. Ces bandes sont ensuite mises à sécher quelques minutes dans une étuve à 100°.

Les différentes intensités de coloration de l'électrophorèse peuvent être traduites par un colorimètre spécial permettant de donner les résultats sous forme de graphiques.

*Résultats :* Nous avons effectué 6 électrophorèses d'Euglobuline $I_1$, soit d'origine animale (3 sérums de cheval antipesteux), soit d'origine humaine (3 sérums pathologiques divers). Dans tous les cas, le papier de migration ne présentait qu'une seule bande étroite bien délimitée. La migration de cette bande se faisait toujours sur une très courte distance, 1 à 1,2 centimètres pour l'Euglobuline $I_1$ de sérum pathologique, 2 centimètres pour l'Euglobuline $I_1$ de sérum de cheval antipesteux. En faisant migrer côte à côte la solution d'Euglobuline $I_1$ et un sérum total, on constate que la bande de l'Euglobuline $I_1$ coïncide avec celle des $\gamma$ -globulines du sérum total (Dessin N° 4).



Electrophorèse d'un sérum de cheval anti-pesteux, et de l'Euglobuline $I_1$ extraite de ce sérum

Les diagrammes obtenus par l'analyse photométrique des bandes d'électrophorèse montre que les solutions d'Euglobuline $I_1$ donnent une courbe homogène ne présentant qu'un seul pic. Par conséquent, l'électrophorèse sur papier permet de retrouver les résultats fournis par l'électrophorèse de Tiselius, à savoir :

1° les préparations d'Euglobuline $I_1$ fournissent une protéine homogène à l'électrophorèse ;

2° cette protéine a une vitesse voisine des $\gamma$ -euglobulines normales ;

3° elle migre un peu en retrait de ces $\gamma$ -euglobulines. L'Euglobuline $I_1$ de Sandor est donc une $\gamma$ -euglobuline lente.

## Stabilité de l'Euglobuline $I_1$ vis-à-vis de la température

Dans les études dont a été l'objet l'Euglobuline $I_1$, on a noté parmi les diverses propriétés de ce corps la thermolabilité. En général, il est admis que l'Euglobuline $I_1$ est détruite par chauffage d'une demi-heure à 56°.

### Action du chauffage à 56° sur les sérums riches en Euglobuline $I_1$.

Pour étudier cette thermolabilité, nous avons utilisé le sérum de cheval antipesteux qui, on le sait, contient de grandes quantités d'Euglobuline $I_1$. Nous avons établi les fiches réticulo-endothéliales des préparations suivantes : 1° Sérum non chauffé ; 2° Sérum chauffé une demi-heure à 56° ; 3° Sérum chauffé une heure à 56° ; 4° Sérum chauffé 4 heures à 56° ; 5° Sérum chauffé 24 heures à 56°.

En relevant le degré opacimétrique correspondant au premier tube de chaque fiche, c'est-à-dire au tube contenant le tampon à pH 7,5, nous avons constaté que la quantité d'Euglobuline $I_1$ diminue dans le sérum au fur et à mesure du chauffage mais que la disparition

complète de cette protéine demande 24 heures de chauffage au bain-marie à 56°. Voici le tableau des degrés opacimétriques obtenus, exprimés en degrés Vernes, selon le temps de chauffage :

| | Degrés Vernes |
|---|---|
| Sérum entier non chauffé ..... | 97 |
| Sérum entier chauffé 1/2 heure à 56° ..... | 60 |
| Sérum entier chauffé 1 heure à 56° ..... | 48 |
| Sérum entier chauffé 4 heures à 56° ..... | 39 |
| Sérum entier chauffé 24 heures à 56° ..... | 8 |

Donc, la thermolabilité de l'Euglobuline $I_1$ dans un sérum est relative puisque cette protéine ne disparaît qu'après un chauffage prolongé.

**Action du chaufage à 56° sur les solutions d'Euglobuline $I_1$.**

Voulant apporter plus de précision à ce chapitre, nous avons essayé l'action de la température sur une solution d'Euglobuline $I_1$ pure. Pour cela, nous avons pris 2 cm3 d'une solution d'Euglobuline $I_1$ en eau physiologique bicarbonatée (Euglobuline extraite du sérum de cheval antipesteux). Nous avons fait une mesure opacimétrique dans le tampon I des fiches réticulo-endothéliales, de pH 7,5 à raison de 2 cm3 du tampon pour 0,05 cm3 de la solution d'Euglobuline $I_1$. L'opacité a été lue au photomètre de Vernes.

La solution restante d'Euglobuline $I_1$ (2 cm3 - 0,05 cm3) a été portée à la température de 56° pendant 1 minute. Cette solution a été centrifugée et transvasée. Un volume de 0,05 cm3 de la solution a été mis dans 2 cm3 du tampon I. L'opacité a été lue au bout d'une demi-heure. La solution d'Euglobuline $I_1$ restante a été portée à une température de 56° pendant 5 minutes, centrifugée, transvasée ; un volume de 0,05 cm3 mis dans 2 cm3 du tampon I, opacité lue au bout d'une demi-heure. Le reste de la solution porté à une température de 56° pendant 15 minutes, centrifugé, transvasé, et ainsi de suite en portant les temps de chauffage à 30 minutes,

1 heure, 14 heures, 16 heures et 24 heures. Nous avons obtenu les résultats d'opacité suivants exprimés en degrés Vernes :

| | Degrés Vernes |
|---|---|
| Solution d'Euglobuline $I_1$ non chauffée ..... | 97 |
| Solution d'Euglobuline $I_1$ chauffée 1 minute à 56° | 97 |
| » » » 5 » » | 96 |
| » » » 15 » » | 96 |
| » » » 30 » » | 95 |
| » » » 1 heure » | 92 |
| » » » 14 » » | 88 |
| » » » 16 » » | 87 |
| » » » 24 » » | 85 |

FIGURE N° 5 : Thermolabilité comparée d'une solution d'Eu $I_1$ et du sérum de cheval antipesteux.

D'après ces résultats, l'Euglobuline $I_1$ en solution pure est thermostable puisque la quantité de cette protéine ne diminue guère après des temps de chauffage allant d'une minute à 24 heures.

*Commentaires :* Les deux séries d'expériences précédentes montrent deux actions différentes de chauffage sur une même protéine. Si la protéine est en solution aqueuse pure, le chauffage à 56°, même prolongé, ne modifie, ni ne dénature, l'Euglobuline $I_1$. Par contre, si le chauffage est appliqué à un sérum riche en Euglobuline $I_1$, celle-ci perd ses caractères de solubilité et disparaît après 24 heures de chauffage (Figure n° 5.)

On peut expliquer ces résultats différents en admettant que le chauffage à 56° favorise les liaisons entre diverses protéines ; l'Euglobuline $I_1$ se combinant aux autres protéines sériques pour former des micelles dont la solubilité diffère de celle de l'Euglobuline $I_1$.

Par conséquent, la thermolabilité de l'Euglobine $I_1$ n'est que relative ; elle n'apparaît que dans les solutions où cette Euglobuline $I_1$ est mêlée à d'autres protéines.

# CHAPITRE III

## ÉTUDE CHIMIQUE DE L'EUGLOBULINE $I_1$

Les études chimiques que nous avons faites sur l'Euglobuline $I_1$ ont porté principalement sur la teneur en lipides et en glucides, un dosage de méthionine a été aussi effectué.

### Taux sérique de l'Euglobuline $I_1$

G. Sandor et J.C. Weill-Fage (15 - 16) ont calculé les taux d'Euglobuline $I_1$ présents dans les sérums normaux et dans certains sérums pathologiques. Ces auteurs ont trouvé des taux d'Euglobuline $I_1$ de l'ordre de 0,6 p. 1.000 dans les sérums normaux. Ils n'ont jamais trouvé, dans ces cas, des taux supérieurs à 0,7 p. 1.000. Ce taux est régulièrement augmenté dans les infections intestinales (fièvre typhoïde, rectocolite) et oscille entre 0,8 et 1 p. 1.000. Le taux est plus augmenté dans l'endocardite lente, dans l'agglomérulo-néphrite évolutive, dans divers états rhumatismaux, et dans certaines affections hépatiques peut atteindre 3,8 p. 1.000. R. Vargues trouve des taux plus importants dans le kala-azar et le paludisme, jusqu'à 10 ou 12 g (7). Le sérum de cheval antipesteux contient en général 10 à 12 g p. 1.000 d'Euglobuline $I_1$. *Le rapport Euglobuline $I_1$/euglobulines totales p. 100* a été trouvé inférieur à 7 p. 100 par G. Sandor. Le taux des euglobulines totales est, selon cet auteur, de 7,5 à 9 g p. 1.000.

### Teneur en lipides liés

a) **Lipides totaux.**

*Technique :* Pour évaluer la teneur en lipides de l'Euglobuline $I_1$, nous avons effectué, selon la technique

de Delsal, le dosage des lipides. Un volume égal à 1 cm3 de solution d'Euglobuline $I_1$ est mélangé à 15 volumes d'un mélange méthylal-méthanol (méthylal 4 parties, méthanol 1 partie). Après agitation, le tout est centrifugé. Le culot recueilli est lavé une fois avec le mélange méthylal-méthanol et une fois à l'eau distillée chaude pour éliminer les sels. Enfin, il est desséché à l'étuve à 100°. Le poids de ce culot desséché fournit le poids de protides de la prise d'essai.

Le liquide surnageant le précipité est soumis à l'évaporation dans l'étuve à 100°. Le résidu est repris par l'éther, filtré sur un filtre sans cendre ; l'extrait etheré est évaporé puis pesé et fournit ainsi le poids des lipides. Il sera possible ultérieurement de doser le cholestérol sur cet extrait étheré.

*Résultats :* Nous avons pu extraire ainsi de l'Euglobuline $I_1$, 1 mmg 5 de lipides totaux à partir de 30,3 mmg d'Euglobuline $I_1$. Le rapport lipides/protides est donc égal à 4,95 p. 100.

b) **Cholestérol.**

*Technique :* Pour l'extraction du cholestérol, on utilise la méthode de Liebermann. Les lipides sont recueillis en solution chloroformique et l'on opère ainsi : solution chloroformique 3,5 cm3 ; anhydride acétique 3,5 cm3 ; acide sulfurique II gouttes. On agite, on fait une lecture colorimétrique après 1/2 heure de contact. On compare avec une solution témoin obtenue de la même manière par addition d'anhydride acétique et d'acide sulfurique à 3,5 cm3 de chloroforme pur. La quantité de cholestérol contenu dans la prise d'essai est donnée en se référant à une courbe d'étalonnage.

*Résultat :* Nous n'avons obtenu que des traces de cholestérol inférieures à 0,1 mmg pour 1 mmg 5 de lipides totaux. Par conséquent, l'Euglobuline $I_1$ contient très peu de lipides liés.

c) **Commentaires.**

Nos résultats confirment ceux obtenus par Sandor (3) et par Vargues (17). Sandor, en effet, trouve que l'Euglobuline $I_1$ contient seulement de 1 à 4,5 p. 100 de son poids en lipides totaux ; dans des sérums de chevaux, Vargues trouve un taux variant de 1 à 7 p. 100. Comme nous, ces auteurs constatent que ces lipides liés comportent peu de stérides ; ils observent encore que les phosphatides sont en quantité très faible dans les lipides extraits de l'Euglobuline $I_1$. Par conséquent, la charge lipidique liée à l'Euglobuline $I_1$ est surtout constituée de graisses neutres. Or, les complexes lipo-protidiques du type de ceux décrits par Machebœuf (18) contiennent peu de glycérides et sont presque exclusivement constitués par des stérides et des phosphatides. De plus, les « graisses libres » du sérum sont surtout faites de glycérides ; enfin, la charge en graisse de l'Euglobuline $I_1$ diminue si on prive préalablement le sérum des graisses libres par filtration sur amiante. (Vargues [17]).

Par conséquent, le taux de lipides liés observé dans les dosages, comporte d'une part une certaine quantité de graisses libres sériques adsorbées au moment de la précipitation de l'Euglobuline $1_1$ et, d'autre part, les graisses réellement liées à l'Euglobuline. Ces dernières sont donc en très faible quantité. Pratiquement, on peut dire que la charge en graisse de l'Euglobuline $I_1$ est négligeable.

## Teneur en glucides liés

*Technique :* Pour le dosage des glucides liés à l'Euglobuline $I_1$, nous avons employé la technique de Sorensens et Haugaard (19).

Les réactifs sont les suivants : 1° Orcinol à 2 p. 100 dans de l'acide sulfurique au quart ; 2° de l'acide sulfurique à 60 p. 100.

Pour effectuer le dosage, on ajoute 1 cm3 de solution d'Euglobuline $I_1$, 2 cm3 de la solution d'orcinol et 15 cm3

d'acide sulfurique à 60 p. 100. On porte le tout au bain-marie à 80° pendant 15 minutes. La lecture se fait au colorimètre avec un écran vert (écran N° 5 du photocolorimètre électrosynthèse) ; les résultats colorimétriques sont comparés à ceux fournis par une gamme étalon contenant galactose et mannose à 1 p. 1.000.

*Résultats :* Une solution d'Euglobuline $I_1$ contenant 35 mmg de protéine par cm3 donne une déviation de 48 divisions de notre photomètre, ce qui correspond à 0,57 mmg de glucides. Le rapport glucides/protides est donc voisin d'1,5 p. 100.

Sandor, utilisant une technique identique, trouve des chiffres compris entre 0,8 et 2,3 p. 100 suivant les préparations (20).

Par conséquent, la teneur de l'Euglobuline $I_1$ en glucides liés est faible puisque certaines euglobulines sériques peuvent contenir jusqu'à 10 p. 100 de sucres liés et que les $\gamma$ -globulines normales contiennent, selon Blix, 3 p. 100 de glucides liés (21).

## Etude de la méthionine constituant de l'Euglobuline $I_1$

Cet examen a été pratiqué par M. le Professeur Agrégé Lissitsky, Maître de Conférences de Chimie Biologique. Nous avons demandé cette recherche dans le but de voir si l'Euglobuline $I_1$ se rapproche des protéines décrites par Delbarre (58 a) et étudiées par Polonovski (58 b).

*Technique utilisée :* La préparation d'Euglobuline $I_1$, dissoute dans de l'eau physiologique bicarbonatée, est hydrolysée par de l'acide chlorydrique (HCl 6N) à 110° pendant 17 heures. L'hydrolysat est ensuite desséché sous vide dans un exsiccateur en présence de potasse ; la dessiccation est poursuivie jusqu'à obtention d'un résidu sec et disparition de toute trace d'acide chlorhydrique. Le résidu est repris par l'eau, puis oxydé par de l'eau oxygénée. On dosera par conséquent la méthionine sulfoxydée formée.

La chromatographie est faite en 2 dimensions en utilisant du butanol acétique (butanol : 78 ; eau : 17, et acide acétique : 5) et du phénol saturé d'eau en atmosphère d'ammoniaque.

La méthionine sulfoxydée formée est repérée sur le papier, les pourtours de la tache sont délimités et la surface ainsi obtenue est comparée à celle d'une gamme étalon.

*Résultat :* L'examen montre que l'Euglobuline $I_1$, soumise à l'analyse (Euglobuline extraite d'un sérum de sujet atteint de cirrhose du foie), contient 0,5 p. 100 de méthionine, le résultat du dosage étant donné à 10 p. 100 près.

*Commentaires :* Bien que nous n'apportions qu'un seul résultat de ce genre, il est intéressant de le confronter avec ceux fournis par Delbarre. En étudiant la cryoprotéine chez un de ses malades, cet auteur trouve que l'hydrolysat de la cryoprotéine contient 0,4 p. 100 de méthionine, alors que l'hydrolysat des protéines sériques, restant après élimination des cryoprotéines, contient 1,75 p. 100 de méthionine. Notre résultat est donc très voisin de celui de Delbarre.

# CHAPITRE IV

## PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES DE L'EUGLOBULINE $I_1$

Dans ce chapitre, nous groupons un certain nombre d'études faites sur le rôle de l'Euglobuline $I_1$ dans certaines réactions classiques de biologie clinique. Notre travail personnel a porté principalement sur les propriétés de l'Euglobuline $I_1$ dans le phénomène de la cryoglobulinémie et sur les propriétés de l'Euglobuline $I_1$ dans les épreuves d'immunologie non spécifique (agglutinines froides, pouvoir anticomplémentaire). Nous avons ensuite confirmé le rôle de l'Euglobuline $I_1$ en immunologie spécifique. A ces recherches, nous ajoutons un bref résumé du rôle de l'Euglobuline $I_1$ dans certaines réactions sériques non spécifiques.

Remarquons que cette étude concerne uniquement les propriétés biologiques de l'Euglobuline $I_1$ dans des réactions effectuées « in vitro ». L'action « in vivo » de l'Euglobuline $I_1$ sera envisagée dans le chapitre suivant.

### Euglobuline $I_1$ et Cryoglobulines

Le terme de « cryoglobulines » (étymologiquement globulines froides) a été créé en 1947 par LERNER et WATSON (22). Chez un sujet atteint de purpura provoqué par un abaissement de la température extérieure, ces auteurs mirent en évidence dans le sérum, une protéine précipitable à froid. Les cryoglobulines sont des protéines sériques présentant la propriété de précipiter ou de gélifier par refroidissement du sérum. Une revue générale concernant ces protéines a été donnée récemment par RAVINA (23). De telles protéines sériques ont été

recherchées systématiquement dans de nombreuses affections à la suite des travaux de Lerner et de ses collaborateurs. C'est ainsi qu'on a décrit la présence de cryoglobulines dans de nombreuses maladies : leucémies, bronchectasies, rhumatismes, endocardites malignes lentes, myelomes multiples, kala-azar, dans certaines affections hépatiques. Remarquons que dans la plupart des maladies citées, la cryoglobulinémie est très faible, le phénomène ne se voit pas à l'œil nu mais doit être recherché par l'analyse chimique. C'est ainsi que, dans de nombreux cas, décrits par Barr (24), le taux de cryoglobuline était seulement de 0,22 g par litre de sérum. Dans quelques cas rarissimes, (celui de Lerner (22), de Barr (24) et de Delbarre (25), le taux de cryoglobuline est massif. Par conséquent, l'existence d'une protéine sérique précipitable à froid est un phénomène non exceptionnel mais, en général, le taux en est extrêmement faible.

Les propriétés particulières de cette protéine suggèrent qu'elle joue un rôle dans certaines manifestations morbides telles que : purpura, acrocyanose, syndrome de Raynaud, marbrures des extrémités, hémorragies nasales, gingivales et rétiniennes, surdité progressive.

Etant donné enfin que cette protéine est aisément isolable, dans les cas où le phénomène de précipitation massive est observé, on a pu étudier ses caractères physiques et chimiques : il s'agit, dans tous les cas étudiés, de $\gamma$ -globulines.

La cryoglobuline présente donc des caractères de solubilité très curieux. Or, l'Euglobuline $I_1$ de Sandor est remarquable, nous l'avons vu, par sa très faible solubilité. Nous avons été amenés à rechercher si l'Euglobuline $I_1$ pouvait jouer un rôle comparable à celui de la cryoglobuline.

**Les solutions d'Euglobuline $I_1$ précipitent à froid.**

Nous avons déjà signalé ce fait dans l'étude des propriétés physiques de l'Euglobuline $I_1$. On a vu en effet qu'un des caractères les plus remarquables de cette

euglobuline était sa très faible solubilité (large bande d'insolubilité dans l'échelle des pH, précipitation rapide avec de faibles quantités de sels neutres...).

Toutes les solutions d'Euglobuline $I_1$, qu'elles proviennent d'un sérum de Cheval, de Chien, ou d'Homme, précipitent au frigidaire : très rapidement, la solution qui était limpide à température ordinaire, devient opalescente, puis en 6 heures, la protéine se rassemble dans le fond du tube, laissant un liquide surnageant à peine teinté. Les dosages chimiques suivants illustrent le phénomène :

| Préparation utilisée | Dosage des protéines dans le surnageant à 37° | Dosage des protéines dans le surnageant à + 4° |
|---|---|---|
| Euglobuline $I_1$ de sérum de cheval | 36,8 mmg par cm3 | 22,0 mmg |
| » » (cirrhotique) .... | 18,0 mmg par cm3 | 6,0 mmg |
| » » (paludisme) .... | 22,0 mmg par cm3 | 8,7 mmg |

On voit donc que tous les protides de la solution ne sont pas cryoglobuliniques puisqu'une certaine quantité reste en solution. Sans doute faut-il attribuer ce fait à la précipitation de $\gamma$ -globulines normales avec l'Euglobuline $I_1$ ; ou bien on peut penser qu'il existe plusieurs fractions dans la globuline de Sandor.

Le caractère cryoglobulinique des solutions de l'Euglobuline $I_1$ est confirmé par le fait que le phénomène est entièrement réversible. En effet, les solutions précédentes précipitées à froid se redissolvent entièrement quand on réchauffe les tubes en les plaçant à l'étuve à 37° : rapidement, la solution reprend son aspect primitif, fortement opalescent. La redissolution est complète, et la centrifugation pratiquée à 37° ne ramène aucun culot.

Signalons enfin que la solution ne demeure stable que si la température de 37° est maintenue ; en effet, dès que les préparations sont placées à la température de 18-20°, la solution s'opacifie et prend un aspect nettement laiteux, non translucide ; à cette température cependant, la précipitation complète ne s'effectue pas et on ne note pas la formation d'un précipité en culot.

**Essais d'isolement de l'Euglobuline $I_1$ par refroidissement des sérums.**

Dans tous les sérums que nous avons étudiés, et même dans le sérum de cheval antipesteux, nous n'avons pas retrouvé le phénomène de cryoglobulinémie massive ; c'est-à-dire que nous n'avons jamais observé la prise en masse du sérum par refroidissement telle qu'elle a été décrite par LERNER.

Cependant, en recherchant systématiquement le phénomène, nous avons pu faire les constatations suivantes :

1° Plusieurs des sérums étudiés, riches en Euglobuline $I_1$, présentent une légère opacification après refroidissement. Pour mettre en évidence cette opacité, nous plaçons les sérums dans la cuve de lecture photométrique et nous chauffons l'ensemble à 37°. Après agitation, on détermine le degré photométrique. On porte alors la cuve contenant le sérum au frigidaire pendant 1 ou 2 heures, puis on refait la lecture photométrique. La différence entre les deux mesures donne le degré d'opacité.

| Sérum étudié | Opacité provoquée par le refroidissement | Taux de l'Euglobuline $I_1$ |
|---|---|---|
| Sérum A | 15° Vernes | 2,20 g |
| Sérum B | 20° Vernes | 10,0 g |

Il existe donc une légère précipitation cryoglobulinique dans les sérums riches en Euglobuline $I_1$.

2° Nous avons essayé de mettre le phénomène plus nettement en évidence en dosant l'Euglobuline $I_1$ d'abord sur le sérum total, puis sur le sérum refroidi et privé de la cryoglobuline précipitante, par centrifugation à froid. Les différences constatées entre les deux dosages ont été infimes dans la plupart des cas, et non significatives. Mais il ne nous est pas possible de tenir compte de tels résultats, puisque nous ne disposons pas de centrifugeuse refroidie.

**Discussion.**

Notre expérimentation, très incomplète, montre cependant que l'Euglobuline $I_1$ présente de grandes analogies avec les cryoglobulines décrites : elle précipite à froid, elle se retrouve dans les mêmes affections que la cryoglobuline, elle a une vitesse électrophorétique voisine. La preuve de l'identité des deux globulines ne pourrait être obtenue qu'en identifiant une cryoglobuline à l'Euglobuline $I_1$, c'est-à-dire en faisant les expériences inverses de celles que nous avons pratiquées.

Le fait le plus net que nous observons est la différence de comportement entre les solutions pures d'Euglobuline $I_1$, solutions qui précipitent très facilement à froid, et le comportement de la même globuline dans le sérum ; dans ce dernier cas, le caractère cryoglobulinique est à peine prononcé. Ce fait est important ; d'une part, il montre bien que le sérum n'est pas une « solution de protéines » dans laquelle seraient mélangées les $\alpha$, $\beta$ et $\gamma$ -globulines et l'albumine, mais que des rapports étroits existent entre les différentes fractions sériques modifiant leurs propriétés de solubilité ; d'autre part, il est possible que le phénomène cryoglobulinique ne soit pas un phénomène aussi simple qu'il apparaît dans les descriptions ; sans doute, des facteurs plasmatiques autres que la seule cryoglobuline doivent intervenir dans la précipitation ou la gélification des sérums par le froid.

## Euglobuline $I_1$ et immunologie non spécifique

### A) EUGLOBULINE $I_1$ ET AGGLUTININES FROIDES

Sous le nom d'agglutinines froides, on désigne la propriété que possèdent certains sérums d'agglutiner les hématies quand on refroidit le mélange « sérum - hématies ». Cette agglutination s'exerce à la fois sur les hématies du sujet ayant fourni le sérum (auto-agglutination) et sur les hématies des sujets du même groupe sanguin (iso-agglutination). La réaction est complètement réver-

sible quand on élève la température. Dans certains cas, cette propriété agglutinante s'exerce non seulement vis-à-vis des globules rouges (hémagglutination froide) mais encore vis-à-vis de tout autre élément en suspension, bactéries, spermatozoïdes (pan-agglutination froide).

Le phénomène d'agglutination à froid est connu depuis les travaux de Hayem (1889), de Donath et Landsteiner (1906). Le phénomène a surtout été observé dans certaines parasitoses (trypanosomiase, paludisme, kala-azar), dans des cas d'adémie hémolytique, dans les cirrhoses du foie, dans certaines splénomégalies chroniques. Récemment, à la suite des travaux de Ramsay et Scanding (27), de Peterson (28)... on a décrit des agglutinines froides dans les cas de pneumonie à virus. Enfin, la présence de telles agglutinines a été signalée dans la mononucléose infectieuse, la rubéole, l'orchite ourlienne...

La diversité des affections provoquant l'apparition des agglutinines froides, doit faire penser que le phénomène ne relève pas d'une seule et même cause et, d'autre part, cette diversité doit conduire à rechercher une protéine non spécifique qui se retrouverait dans ces différentes affections et qui aurait la propriété d'agglutiner à froid les hématies. Or, nous remarquons que la plupart des maladies rappelées plus haut provoquent justement l'apparition de quantités importantes d'Euglobuline $I_1$.

Pour étudier les rapports entre l'Euglobuline $I_1$ et l'agglutination à froid, nous avons comparé les richesses respectives des sérums en agglutinines froides et en Euglobuline $I_1$, puis analysé le rôle de l'Euglobuline $I_1$ dans le phénomène de l'agglutination froide.

**Techniques utilisées.**

La recherche des agglutinines froides est facile, mais exige cependant des précautions techniques sur lesquelles tous les auteurs ont longuement insisté : Rose (29), Eyquem (30 *a, b, c*), Dacie (31).

Nous avons employé plusieurs techniques.

a) *Technique qualitative :* La recherche se fait comme pour un groupage sanguin : une goutte de sérum est ajoutée à une goutte de suspension globulaire (du groupe 0), le tout est mêlé sur une lame de verre qui est portée à + 4°. Les résultats de l'agglutination se lisent à la loupe. Cette technique grossière est intéressante du fait de sa rapidité et de sa simplicité ; elle ne peut être utilisée qu'avec des sérums fortement agglutinants.

b) *Technique quantitative :* Toutes les techniques quantitatives reposent sur le même principe ; des dilutions variées de sérum sont additionnées de suspension globulaire, les mélanges sont placés en glacière et observés après un temps variable. Cependant, les modes techniques diffèrent d'un auteur à l'autre, en ce qui concerne la quantité de globules rouges mis en présence des dilutions sériques et en ce qui concerne le mode de lecture. Nous avons tour à tour utilisé les techniques de M. Zermati (32-33), de Rose (29) et d'Eyquem (30 *a, b, c*). Cette dernière nous semble particulièrement sensible.

**Technique de recherche des agglutinines froides selon Eyquem (30, a - b - c).**

Dans des tubes à hémolyse, on fait des dilutions sériques de telle sorte que le volume de chaque dilution soit de 0,2 cm3 ; dans chaque tube, on ajoute 0,05 cm3 d'une suspension à 2 p. 100 de globules rouges de groupe O,Rh + ; les tubes sont agités et placés à la glacière à + 4°. La lecture se fait 18 heures après en notant au miroir concave la fin de l'agglutination. Nous exigeons la présence d'agglutinats nets pour affirmer l'existence d'agglutinines froides, et nous ne nous contentons pas du seul aspect déchiqueté du pourtour du culot globulaire. Selon la grosseur des agglutinats, on note l'agglutination avec les signes +++, ++ ; +. Avec cette technique, il n'est pas rare d'observer dans les sérums pathologiques des taux dépassant le 1/100. Chez les sujets normaux, les taux d'agglutination sont le plus souvent nuls, mais quelquefois on note des taux de l'ordre du 1/4 ou du 1/8.

**Taux de l'agglutination à froid et dosage de l'Euglobuline $I_1$.**

Nous avons recherché le taux d'agglutinines froides chez 26 sujets chez lesquels nous avons déterminé en même temps la quantité d'Euglobuline $I_1$. Le tableau suivant expose les résultats :

| Numéro des sérums | Maladie | Taux des agglutinines froides | Dosage de l'Eu $I_1$ |
|---|---|---|---|
| 1 | Cirrhose ..... | 1/500 | 3,2 g |
| 2 | Splénomégalie .... | 1/64 | 2,8 g |
| 3 | Paludisme ..... | 1/64 | 2,3 g |
| 4 | Anémie ..... | 1/16 | 1,8 g |
| 5 | Cirrhose ..... | 1/64 | 1,7 g |
| 6 | Splénomégalie .... | 1/16 | 1,5 g |
| 7 | Cirrhose ..... | 1/32 | 1,3 g |
| 8 | Maladie du sommeil | 1/8 | 1,2 g |
| 9 | Cirrhose ..... | 1/32 | 1,2 g |
| 10 | Splénomégalie .... | 1/128 | 1,2 g |
| 11 | Anémie ..... | 1/64 | 1,2 g |
| 12 | Cirrhose ..... | 1/4 | 1,1 g |
| 13 | Cirrhose ..... | 1/16 | 1,1 g |
| 14 | Cirrhose ..... | 1/8 | 1,0 g |
| 15 | Paludisme ..... | 0 | 1,0 g |
| 16 | Splénomégalie .... | 1/128 | 1,0 g |
| 17 | Thalassémie ..... | 1/4 | 0,9 g |
| 18 | Hépatite ..... | 1/2 | 0,8 g |
| 19 | R.A.A. ..... | 1/2 | 0,7 g |
| 20 | Cirrhose ..... | 1/32 | 0,7 g |
| 21 | Cirrhose ..... | 1/2 | 0,6 g |
| 22 | Cirrhose ..... | 1/16 | 0,5 g |
| 23 | Diabète ..... | 0 | 0,4 g |
| 24 | Diabète ..... | 0 | 0,4 g |
| 25 | Anémie ..... | 0 | 0,4 g |
| 26 | R.A.A. ..... | 0 | 0,3 g |

De ce tableau, il ressort nettement un certain parallélisme entre le taux des agglutinines froides et la quantité d'Euglobuline $I_1$. En effet, le phénomène d'agglutination n'apparaît nettement que si la quantité d'Euglobuline $I_1$ est supérieure à 1 g par litre, et l'agglutination est d'autant plus forte que le taux d'Euglobuline $I_1$ est plus élevé (sérums n$^{os}$ 1, 2 et 3).

Cependant, le parallélisme n'est pas absolu, il existe quelques exceptions : par exemple, le sérum n° 20 possède une agglutinine froide active au 1/32 alors que la quantité d'Euglobuline $I_1$ est à peine supérieure à la normale ; le sérum 15 présente le phénomène inverse.

Des observations comparables ont été faites avec les sérums animaux étudiés. Le sérum de cheval antipesteux, mis en présence de globules rouges de cheval, agglutine ces hématies. L'agglutination commence déjà à 35° (intensité faible) ; à température du laboratoire, l'agglutination est massive et se lit aisément sur lame comme on lit un groupage sanguin (4). A + 4°, il en est de même : après 10 heures de séjour à cette température, le culot globulaire forme un disque dentelé, quelques agrégats globulaires restant accrochés aux parois du tube. Or, ce sérum de cheval antipesteux contient 10 g d'Euglobuline $I_1$ par litre. Avec les sérums de chiens atteints de kala-azar, les mêmes observations ont été faites : ces sérums agglutinent à froid les hématies de chien ; le taux d'agglutination est faible cependant, mais en rapport avec la quantité d'Euglobuline $I_1$ qui était de 1,8 g par litre dans ces sérums.

### Propriétés hémagglutinantes à froid des solutions d'Euglobuline $I_1$.

La preuve directe de la propriété hémagglutinante à froid de l'Euglobuline $I_1$ est de réalisation facile : il suffit d'isoler, selon les techniques données au chapitre I, l'Euglobuline $I_1$ à partir d'un sérum anormal, et de mettre la solution obtenue en présence de suspension globulaire.

Une solution d'Euglobuline $I_1$ extraite du sérum de cheval antipesteux, solution titrant 58 g de protéine par litre, agglutine les hématies à la dilution du 1/16. Il semble donc que le taux actif de l'Euglobuline ainsi isolée soit de 3,6 mg par litre, au-dessous de ce taux la propriété hémagglutinante n'apparaît plus.

Il en est de même avec l'Euglobuline $I_1$ recueillie à partir des sérums humains et mise en présence de globules rouges humains. Une solution contenant 12,5 g d'Euglobuline $I_1$, agglutine encore les hématies quand on la dilue au 1/20, c'est-à-dire quand le taux de l'Euglobuline est de 0,62 g par litre.

Des exemples semblables sont rapportés au paragraphe suivant. Tous démontrent que les solutions d'Euglobuline $I_1$ ont les propriétés des agglutines froides. Notons cependant que le taux minimum actif semble plus élevé que dans le sérum.

**Propriétés hémagglutinantes des sérums fractionnés.**

Afin de préciser le rôle de l'Euglobuline $I_1$ comme agglutinine froide, nous avons traité 8 sérums de la manière décrite au chapitre I. Pour chaque échantillon, on dispose donc de trois préparations : 1° le sérum total ; 2° le sérum privé de l'Euglobuline $I_1$ ; 3° La solution d'Euglobuline $I_1$. Avec ces préparations, on détermine les taux d'agglutination. Les résultats sont les suivants :

| | Sérum total | Sérum privé de Eu $I_1$ | Solution d'Eu $I_1$ |
|---|---|---|---|
| Sérum A ..... | 1/16 | 0 | 1/32 |
| Sérum B ..... | 1/16 | 1/1 | 1/64 |
| Sérum C ..... | 1/32 | 0 | 1/32 |
| Sérum D ..... | 1/64 | 1/8 | 1/128 |
| Sérum E ..... | 1/64 | 1/4 | 1/256 |
| Sérum F ..... | 1/16 | 1/2 | 1/128 |
| Sérum G ..... | 1/64 | 1/1 | 1/256 |
| Sérum H ..... | 1/128 | 1/32 | 1/256 |

Par conséquent, pour tous ces sérums, la séparation de l'Euglobuline $I_1$ par dialyse suffit à supprimer presque complètement la propriété d'agglutiner à froid ; cette propriété se retrouve entièrement dans la solution d'Euglobuline $I_1$ ; le taux obtenu est généralement plus élevé que celui du sérum car la dissolution s'est faite dans un volume moindre, il y a donc eu concentration de l'activité hémagglutinante à froid. Seul le sérum H semble faire exception ; en réalité, il s'agit d'une technique mauvaise de dialyse, la quantité d'Euglobuline éliminée a été très faible.

Signalons enfin que pour les sept sérums actifs, l'établissement de la fiche réticulo-endothéliale sur les sérums dialysés exprime la disparition de l'Euglobuline $I_1$, alors qu'une certaine quantité d'Euglobuline $I_1$ subsiste dans le sérum H dialysé.

**Remarques.**

Au cours de nos recherches sur les agglutinines froides, nous avons constaté les deux faits suivants :

1° l'auto-agglutination est toujours plus forte que l'issoagglutination. Ce phénomène a été signalé par la plupart des chercheurs ; il se retrouve chaque fois qu'on compare les agglutinations faites avec des globules rouges frais. Le phénomène peut manquer si les hématies utilisées pour l'isoagglutination sont prélevées depuis plusieurs jours. D'autre part, l'auto-agglutination a un taux plus fort si les hématies sont insuffisamment lavées. Il semble donc que l'Euglobuline $I_1$, agglutinine froide, peut se fixer sur les hématies *in vivo*, dans le torrent circulatoire même ; l'élution par lavage de cette Euglobuline serait incomplète.

2° Au cours de la recherche des agglutinines froides, on peut mettre en évidence le phénomène d'hémolyse à froid ; il suffit de laisser les tubes pendant 48 heures à la glacière, puis de les porter à l'étuve à 37°, on obtient une hémolyse partielle dans les tubes où était observée l'agglutination à froid.

**Discussion.**

Les expériences précédentes confirment donc les résultats déjà signalés par R. Vargues (4) et Zermati et Vargues (34). Elles prouvent que l'Euglobuline $I_1$ est une agglutinine froide. D'ailleurs, certaines descriptions des propriétés des agglutinines froides suggèrent vivement cette identité. En effet, rappelons certains caractères des agglutinines froides ; leur spécificité est loin d'être absolue, elles peuvent apparaître après irritation du système réticulo-endothélial, elles sont thermolabiles, ne traversent pas le placenta, ce sont des $\gamma$ -globulines. Or, ces mêmes propriétés ont été décrites pour l'Euglobuline $I_1$. Il est vrai que certains auteurs contestent la thermolabilité de l'agglutinine froide. Ceci vient du fait que le chauffage à 56° d'un sérum pendant 1/2 heure constitue une épreuve purement conventionnelle qui suffit à provoquer la dénaturation incipiente des sérums normaux ou subnormaux ; avec les sérums anormaux, nous avons vu qu'il faut parfois chauffer le sérum pendant 24 heures pour faire disparaître toute trace d'Euglobuline $I_1$. D'ailleurs, en ce qui concerne l'agglutinine froide, tous les auteurs admettent sa dénaturation par chauffage à 65° pendant 1/2 heure, température à laquelle les anticorps classiques sont stables.

Le fait que l'Euglobuline $I_1$ soit une agglutinine froide explique le phénomène d'hémagglutination à froid chez les sujets sains. En effet, il existe toujours une petite quantité d'Euglobuline $I_1$ à l'état normal ; cette quantité est insuffisante pour provoquer une forte agglutination froide, mais peut suffire quand on utilise des techniques particulièrement sensibles comme celle de Dacie (31).

Remarquons que les sérums qui doivent leur propriété hémagglutinante à l'Euglobine $I_1$, ne peuvent plus être considérés comme des sérums possédant des auto-anticorps. L'Euglobuline $I_1$ ne résulte pas de la réponse spécifique de l'organisme à une excitation antigénique ou même auto-antigénique ; elle résulte de l'inflammation macrophagique non spécifique.

Par conséquent, dans les cas qui nous occupent, l'agglutination froide perd complètement ses caractères anticorps. Le phénomène de l'agglutination doit s'expliquer par les seuls caractères physiques de faible solubilité de l'Euglobuline $I_1$. Il peut être conçu ainsi : dans un premier temps, *in vitro* ou même *in vivo*, les hématies adsorbent sur leur surface une certaine quantité d'Euglobuline $I_1$. Dans un deuxième temps, quand on refroidit le mélange « sérum + suspension globulaire », l'Euglobuline $I_1$ non adsorbée tend à précipiter puisque l'Euglobuline $I_1$ est insoluble à froid ; elle forme des agrégats qui se lient avec les molécules d'Euglobuline $I_1$ fixées sur les hématies. Dans un troisième temps, l'agglutination de ces agrégats entraîne une agglutination lâche des globules rouges.

Terminons en insistant sur un point important. Nos expériences montrent que l'Euglobuline $I_1$ est agglutinante à froid ; elles permettent d'expliquer de manière satisfaisante certaines propriétés des agglutinines froides. Cependant, elles ne donnent pas le droit d'affirmer que toute agglutination froide est due à l'Euglobuline $I_1$. D'une part, notre expérience est encore incomplète puisque nous n'avons pas eu l'occasion d'étudier des affections telles que les pneumonies à virus où les taux d'agglutination relatés sont très élevés. D'autre part, le phénomène d'agglutination froide nous semble dépendre, dans les sérums que nous avons étudiés, non seulement de l'Euglobuline $I_1$, mais encore d'autres facteurs sériques puisque certains sérums riches en Euglobuline $I_1$ n'ont pas d'agglutine froides et inversement. Seules, des études plus approfondies pourront nous faire savoir si, dans tous les cas, l'agglutination est un phénomène non spécifique et si les agglutinines froides doivent être supprimées dans le chapitre des auto-anticorps.

**Résumé.**

Ce chapitre montre donc que l'Euglobuline $I_1$ possède les propriétés d'une agglutinine froide. Les solutions d'Euglobuline $I_1$ agglutinent des globules homologues à

froid. Les sérums riches en Euglobuline $I_1$ ont la même propriété ; ils la perdent quand on les prive de la fraction euglobulinique $I_1$. Par conséquent, dans les cas étudiés, groupant des maladies telles que le paludisme, la trypanosomiase, les cirrhoses hépatiques, les splénomégalies, l'agglutination froide présentée par les sérums n'est pas un phénomène immunologique du type des réactions antigènes - anticorps, mais un phénomène physique résultant de la faible solubilité de l'Euglobuline $I_1$ de Sandor.

## B) EUGLOBULINE $I_1$ ET POUVOIR ANTI-COMPLÉMENTAIRE

On désigne sous le nom de « pouvoir anticomplémentaire » la propriété d'un sérum de s'opposer à l'action lytique de l'alexine sur des globules rouges sensibilisés. Ce pouvoir anticomplémentaire a fait l'objet d'études nombreuses en sérologie. Ce pouvoir se manifeste surtout dans les réactions de fixation du complément du type réaction de Hecht, c'est-à-dire dans les réactions faites avec l'alexine même du sérum étudié (réaction au sang frais). Dans la plupart des cas, le pouvoir anticomplémentaire des sérums disparaît par chauffage à 56° pendant 1/2 heure, il ne perturbe donc pas les réactions sérologiques classiques du type Bordet-Wassermann, utilisant l'alexine de cobaye.

Les recherches systématiques du pouvoir anticomplémentaire du sérum frais ont permis de retrouver ce pouvoir dans un certain nombre d'affections, en particulier dans le kala-azar, la maladie du sommeil, le paludisme, le myélome multiple, la lymphogranulomatose, les cirrhoses du foie (35).

Plus récemment, Davis et ses collaborateurs (36) ont montré que les $\gamma$ -globulines obtenues à partir des sérums humains, par séparation électro-phorétique, sont anticomplémentaires à de fortes dilutions. Gutman et Williams (37) remarquent que le pouvoir anticomplémentaire est supporté par la fraction euglobulinique. Enfin, le

composant γ -globuline anticomplémentaire semble, selon ces auteurs, être une γ -globuline anormale.

Ces différentes remarques bibliographiques nous ont incité à étudier le rôle anticomplémentaire possible de l'Euglobuline $I_1$. Cette recherche était encore indiquée par les observations faites par Zermati (32) qui constata, dès 1946, que les sérums riches en agglutinines froides étaient fortement anticomplémentaires.

**Technique de dosage de l'activité anti-complémentaire.**

Le dosage nécessite la préparation des produits suivants :

1° le sérum ou la solution globulinique dont on veut doser le pouvoir anticomplémentaire ;

2° des globules rouges de mouton : ces globules sont lavés trois fois dans l'eau physiologique, puis mis en suspension dans l'eau salée à 9 p. 1.000 (2 cm3 du culot globulaire pour 100 cm3 d'eau physiologique) ;

3° du sérum hémolytique anti-mouton de l'Institut Pasteur. Ce sérum est dilué au 1/200 dans l'eau physiologique ;

4° de l'alexine de cobaye. Nous avons utilisé du sérum frais ou du sérum conservé dans la solution hypertonique de Mounier.

Avec ces réactifs, on effectue d'abord le dosage du complément du jour selon les techniques classiques, avec incubation de 30 minutes à 37°. Pour le dosage de l'activité anticomplémentaire, on utilise une dilution de complément telle que 0,5 cm3 de cette dilution contiennent 2 unités alexiques.

Le dosage de l'activité anticomplémentaire se fait selon le tableau suivant :

| Numéro des tubes | Témoin | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Sérum à étudier ..... | 0 | 0,1 | 0,2 | 0,3 | 0,4 | 0,5 |
| Eau physiologique .... | 0,5 | 0,4 | 0,3 | 0,2 | 0,1 | 0 |
| Alexine (2 unités) .... | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| G. R. de mouton .... | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Sérum anti-mouton ... | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |

Les tubes sont agités et portés pendant 1/2 heure dans l'étuve à 37°. On lit alors les résultats de l'hémolyse.

**Pouvoir anti-complémentaire des solutions d'Euglobuline $I_1$.**

La détermination de ce pouvoir anticomplémentaire a été faite avec des solutions d'Euglobuline $I_1$ provenant des sérums de Cheval, de Chien et d'Homme.

1° *L'Euglobuline $I_1$ du sérum de cheval antipesteux :* Nous avons utilisé une solution contenant 58 g de cette protéine par litre. Avec une telle concentration, l'hémolyse est inhibée dans les cinq tubes de réaction. Il faut diluer au 1/5 la solution pour que cesse l'effet anticomplémentaire dans les deux premiers tubes de la réaction, tubes qui contiennent respectivement 0,1 et 0,2 cm3 de cette solution d'Euglobuline $I_1$. Par conséquent dans les conditions de la réaction, une quantité de 4,6 mmg d'Euglobuline $I_1$ a inhibé 2 unités alexiques.

2° *L'Euglobuline $I_1$ du sérum de chien atteint de kala-azar :* Des constatations analogues ont été faites avec une solution contenant 30 g d'Euglobuline $I_1$ par litre : diluée au 1/5, cette solution inhibe l'hémolyse dans les quatre derniers tubes de réaction, par conséquent une quantité de 1,2 mmg d'Euglobuline $I_1$ inhibe, dans ce cas, deux unités alexiques.

3° *L'Euglobuline $I_1$ des sérums humains :* Nous avons étudié le pouvoir anticomplémentaire de solutions d'Euglobuline $I_1$ extraite de sérums de cirrhotiques et de paludéens. Nous avons trouvé dans ces cas un pouvoir anticomplémentaire net. Les chiffres suivants donnent la quantité d'Euglobuline $I_1$ inhibant deux unités alexiques :

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Sérum A | 3,6 mmg | d'Euglobuline $I_1$ | inhibent | 2 | unités | alexiques |
| Sérum B | 2,4 mmg | » | » | » | » | » |
| Sérum C | 3,2 mmg | » | » | » | » | » |
| Sérum D | 2,9 mmg | » | » | » | » | » |

Par conséquent, le pouvoir anticomplémentaire est évident. Dans tous les cas, on observe que la dose nécessaire pour inhiber deux unités alexiques est comprise entre 1 et 5 mmg.

**Recherche du pouvoir anti-complémentaire des sérums riches en Euglobuline $I_1$.**

Les constatations faites avec les solutions d'Euglobuline $I_1$ se retrouvent avec les sérums qui ont fourni cette Euglobuline. L'activité anticomplémentaire de ces sérums est surtout importante dans les sérums vieillis puisque l'alexine propre des sérums ne s'ajoute pas aux deux unités alexiques fournies par le sérum de cobaye.

Le sérum de cheval antipesteux inhibe deux unités alexiques à la dose de 0,3 cm3 de sérum pur.

Le sérum de chien atteint de kala-azar est fortement anticomplémentaire puisque 0,1 cm3 de ce sérum inhibe encore les deux unités alexiques.

Enfin, les sérums humains riches en Euglobuline $I_1$ ont des activités anticomplémentaires variées ; cette activité anticomplémentaire fait généralement défaut dans les sérums normaux.

Les chiffres suivants illustrent ce fait :

| Numéro des sérums | Quantité inhibant deux unités alexiques | Dosage de l'Euglobuline $I_1$ |
|---|---|---|
| 1 | 0,05 cm3 | 3 g |
| 2 | 0,2 » | 2,1 » |
| 3 | 0,3 » | 1,5 » |
| 4 | 0,1 » | 1,4 » |
| 5 | 0,4 » | 1,0 » |
| 6 | 0,4 » | 1,0 » |
| 7 | 0,3 » | 0,9 » |
| 8 | 0,4 » | 0,8 » |

Les sérums humains normaux ne manifestent aucune activité anticomplémentaire dans les réactions de dosage. Par conséquent, le taux d'Euglobuline $I_1$ semble déterminer l'activité anticomplémentaire.

**Le chauffage à 56° du sérum fait disparaître en même temps le pouvoir anticomplémentaire et l'Euglobuline $I_1$.**

Ces essais ont porté sur le sérum de cheval antipesteux. Ce sérum convient particulièrement bien, car il

ne possède par lui-même aucun pouvoir alexique en raison de la durée de sa conservation à la glacière.

Le sérum a été chauffé au bain-marie à 56° pendant 30 minutes, puis 1 heure, 4 heures et 24 heures. Après chaque chauffage, une partie du sérum était prélevée pour doser, d'une part l'activité anticomplémentaire et, d'autre part, la quantité d'Euglobuline précipitant à pH 7,4.

Le tableau suivant indique le résultat des dosages :

| | Activité anticomplémentaire | | | | | | Taux |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Témoin | 0,1 | 0,2 | 0,3 | 0,4 | 0,5 | d'Eu $I_1$ |
| | — | — | — | — | — | — | — |
| Sérum non chauffé | +++ | + | 0 | 0 | 0 | 0 | 8,5 g |
| Sérum chauffé 30 m. | +++ | +++ | ++ | + | 0 | 0 | 3,1 g |
| Sérum chauffé 1 h. | +++ | +++ | +++ | ++ | + | 0 | 2,7 g |
| Sérum chauffé 4 h. | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | 0 | 2,1 g |
| Sérum chauffé 24 h. | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | + | 0,8 g |

Dans ce tableau, le degré d'hémolyse obtenu est indiqué par des croix (+++ = hémolyse totale ; ++ = hémolyse partielle et + = début d'hémolyse).

On voit que le sérum non chauffé est fortement anticomplémentaire puisque deux unités alexiques sont inhibées par 0,1 cm3 de sérum ; ce sérum non chauffé contient 8,5 g d'Euglobuline $I_1$ par litre. A mesure que la durée de chauffage se prolonge, le pouvoir anticomplémentaire diminue ; en même temps, on constate que la quantité d'Euglobuline précipitable à pH 7,4 diminue. Ce n'est qu'après 24 heures de chauffage à 56° que le pouvoir anticomplémentaire disparaît presque complètement ; à cette durée de chauffage correspond d'ailleurs une disparition presque complète de l'Euglobuline $I_1$.

Cette expérience souligne l'importance du taux de l'Euglobuline $I_1$ dans le degré d'anticomplémentarité d'un sérum. Elle montre encore la forme conventionnelle de la notion de chauffage à 56° : en effet, les modifications apportées par le chauffage ne sont pas brutales mais progressives.

**Disparition de l'activité anti-complémentaire des sérums après élimination de l'Euglobuline $I_1$.**

L'expérience a porté sur cinq sérums différents riches en Euglobuline $I_1$ et présentant un fort pouvoir complémentaire. Les sérums ont été dialysés et privés de l'Euglobuline $I_1$, puis le dosage de l'activité anticomplémentaire a été fait en même temps sur le sérum privé de l'Euglobuline $I_1$, sur la solution d'Euglobuline $I_1$ et sur le sérum reconstitué.

Pour simplifier les manipulations, une seule dose de 0,5 cm3 a été utilisée. Le tableau suivant donne le schéma expérimental et les résultats de l'hémolyse :

| Préparation à doser (0,5 cm3) | Sérum privé d'Eu $I_1$ | Solution d'Eu $I_1$ | Sérum reconstitué |
|---|---|---|---|
| Sérum hémolytique | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Hématies à 2 p. 100 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Alexine (2 unités) .. | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Sérum I ..... | +++ | 0 | 0 |
| Sérum II ..... | +++ | 0 | + |
| Sérum III ..... | +++ | + | 0 |
| Sérum IV ..... | +++ | 0 | 0 |
| Sérum V ..... | 0 | ++ | 0 |

Par conséquent, le pouvoir anticomplémentaire disparaît si on supprime l'Euglobuline $I_1$ ; il se retrouve dans les solutions de cette Euglobuline et réapparaît quand on reconstitue le sérum. Le sérum V fait exception en apparence : le sérum total inhibe l'hémolyse, le sérum dialysé fait de même alors que le précipité de dialyse n'a aucune action, il s'agit dans ce cas d'un échec de la dialyse.

**Remarques.**

Les différents dosages que nous avons pratiqués, l'analyse du pouvoir anticomplémentaire des solutions d'Euglobuline $I_1$ et des sérums modifiés par chauffage,

et la dialyse montre bien que l'Euglobuline $I_1$ possède un fort pouvoir anticomplémentaire et que sa présence dans un sérum en quantité anormale détermine l'activité anticomplémentaire de ce sérum.

Cependant, on ne peut conclure que l'Euglobuline $I_1$ est la *condition nécessaire* du pouvoir anticomplémentaire. En effet, il faut rappeler que le pouvoir anticomplémentaire des sérums n'est pas toujours thermolabile, il existe des sérums qui demeurent anticomplémentaires après chauffage prolongé ; dans ces cas, l'Euglobuline $I_1$ n'est pas la cause du pouvoir anticomplémentaire. Cependant, dans des travaux actuellement en cours, au Laboratoire de Bactériologie, on observe que les sérums anticomplémentaires, après chauffage à 56° pendant 1/2 heure, sont des sérums qui contiennent toujours des quantités notables d'Euglobuline $I_1$.

D'un autre côté, l'Euglobuline $I_1$ n'est pas la *condition suffisante* pour qu'existe un pouvoir anticomplémentaire. En effet, non rarement, nous avons observé l'absence de pouvoir anticomplémentaire avec des sérums cependant riches en Euglobuline $I_1$. De plus, nous avons observé chez un même sujet, des variations du pouvoir anticomplémentaire du sérum, variations non accompagnées d'une modification du taux sérique de l'Euglobuline $I_1$. Enfin, dans quelques cas, au début de nos essais, la recherche du pouvoir anticomplémentaire paraissait décevante ; un même sérum frais, riche en Euglobuline $I_1$, tantôt inhibait l'hémolyse, tantôt restait sans action. Ces résultats contradictoires sont expliqués dans les recherches qui font l'objet des pages suivantes.

**Résumé.**

L'étude du pouvoir anticomplémentaire de l'Euglobuline $I_1$ nous a montré les faits suivants :

1° Les solutions d'Euglobuline $I_1$ sont fortement anticomplémentaires ; des doses de 1 à 5 mmg d'Euglobuline $I_1$ inhibent l'activité de deux unités alexiques ;

2° Les sérums riches en Euglobuline $I_1$ possèdent un net pouvoir anticomplémentaire ;

3° Le pouvoir anticomplémentaire de tels sérums disparaît si on détruit l'Euglobuline $I_1$ par chauffage du sérum à 56° ou si on extrait par dialyse cette Euglobuline.

Cependant, certaines de nos observations montrent que la présence d'Euglobuline $I_1$ ne peut expliquer dans tous les cas le pouvoir anticomplémentaire des sérums.

### C) EUGLOBULINE $I_1$ ET DOSAGE DE L'ALEXINE

Nous venons d'établir que l'Euglobuline $I_1$ est douée d'une forte activité anticomplémentaire. Cette activité s'exerce nettement dans la technique classique du dosage de l'activité anticomplémentaire : le sérum riche en Euglobuline $I_1$ inhibe l'alexine de cobaye. On doit aussitôt se demander si cette inhibition du pouvoir anticomplémentaire ne peut pas s'exercer vis-à-vis de l'alexine même du sujet ; en d'autres termes, la présence d'Euglobuline $I_1$ dans un sérum frais inhibe-t-elle l'action alexique de ce sérum frais au point de masquer le pouvoir alexique ? Avant de répondre à cette question par des expériences, il est nécessaire de rappeler certains points concernant le dosage de l'alexine des sérums humains.

L'alexine est un complexe protidique du sérum formé au moins de 4 composants désignés par les symboles C'1, C'2, C'3 et C'4. Les deux premiers composants sont thermolabiles, le premier est une $\gamma$ -euglobuline et le second une $\alpha$ -globuline. Le complexe alexique a pour principale propriété de lyser les antigènes sensibilisés en se fixant énergiquement sur le couple « antigène-anticorps ».

Cette propriété lytique de l'alexine est largement employée dans les réactions immunologiques effectuées *in vitro*. Mais le rôle physiologique de l'alexine est encore peu connu. En 1902, Wassermann a cependant suggéré que le taux de l'alexinémie pouvait servir de mesure de la résistance générale de l'organisme. Aussi, un certain nombre de recherches, peu nombreuses il est vrai, ont

eu pour objet de doser l'alexine chez les sujets humains malades. Parmi les plus récentes études faites sur ce sujet, citons celles de Ranque, 1942 (38) et de Vargues, 1947 (39).

A certains égards, les résultats de ces recherches sont intéressants ; en effet, les variations du titre alexique sont parfois importantes et correspondent à des états cliniques précis. Par exemple, R. Vargues avec Zermati (34) a pu suivre la courbe de l'alexinémie au cours des divers stades du paludisme humain et tirer des indications pronostiques de ces dosages.

Les recherches sur le titre alexique des sérums humains montrent que les maladies provoquant des chutes du taux alexique sont les suivantes : paludisme, maladie du sommeil, kala-azar, cirrhoses du foie, septicémies bactériennes... ensemble de maladies que nous avons déjà rencontrées dans les chapitres précédents et que nous savons riches en Euglobuline $I_1$.

D'autre part, en essayant de préciser la cause de l'absence d'alexine dans le sérum de certains paludéens, R. Vargues (39) a observé que le chaînon terminal C'2 existait dans ce sérum, mais que le chaînon C'1, médian, ne manifestait pas son action. Or, ce chaînon est précisément $\gamma$ -euglobulinique.

Nos études sur l'Euglobuline $I_1$ nous amènent donc à revoir entièrement les données sur les états d'hypo et d'analexinémie, et à rechercher si le seul effet de l'action anticomplémentaire de l'Euglobuline $I_1$ n'est pas suffisante pour expliquer les variations dans le dosage de l'alexine sérique humaine.

### Technique de dosage.

Nous avons repris les techniques employées par R. Vargues (39) : afin d'éliminer les causes d'erreur dues à la présence d'hémolysine naturelle, nous avons utilisé l'action de l'alexine humaine vis-à-vis des globules rouges sensibilisés par un sérum anti-humain.

*Préparation des sérums anti-humains :* Les quantités nécessaires de sérum hémolytique anti-humain nous ont été fournies par deux lapins préparés comme suit : On épile la peau du dos et des flancs des lapins, de façon à avoir une large surface cutanée. A l'aide d'une aiguille de cinq dixièmes de mm de diamètre, on pratique une vingtaine d'inoculations dans le derme de l'animal ; chaque bouton intradermique recevant environ 1/2 cm3 d'une suspension épaisse de globules rouges humains O, Rh+. Des inoculations semblables sont répétées le 5e, le 10e, le 15e et le 20e jours. A ce moment, on titre la sensibilisatrice formée en présence de 0,2 cm3 de sérum frais provenant d'un sujet sain et de 0,5 cm3 de globules rouges humains du groupe O. Avec nos deux lapins, nous avons obtenu des titres de 1/50 et 1/30. Cette méthode de préparation du sérum hémolytique est recommandable en raison de sa simplicité, de sa rapidité ; elle n'entraîne jamais de choc chez l'animal et n'exige qu'une stérilité relative de la préparation globulaire.

Lorsque le titre hémolytique du sérum de lapin est jugé convenable, le lapin est saigné à blanc, son sérum est recueilli, distribué en ampoules qui sont chauffées à 56° pendant 1/2 heure. Les ampoules sont conservées au frigidaire.

*Dosage :* Pour effectuer le dosage, on dispose :

1° de globules rouges humains du groupe O, Rh+, lavés trois fois et mis en suspension dans l'eau physiologique (2 cm3 de purée globulaire pour 100 cm3 d'eau salée à 9 p. 1.000) ;

2° du sérum hémolytique dilué au titre voulu (1/50 ou 1/30) ;

3° du sérum frais dans lequel on veut doser l'alexine.

La réaction de dosage se fait selon le tableau suivant :

| Numéro des tubes | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|---|---|---|---|---|
| Globules rouges humains (O, Rh+) ..... | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Sérum hémolytique dilué | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Eau physiologique ..... | 0,9 | 0,8 | 0,6 | 0,4 | 0,2 |
| Sérum humain à doser .. | 0,1 | 0,2 | 0,4 | 0,6 | 0,8 |

Les tubes sont agités et portés à l'étuve à 37°. Une demi-heure après, on note les résultats d'hémolyse.

Nous exprimerons les résultats de ces dosages de la manière suivante : :

— hémolyse totale dans tous les tubes = alexinémie augmentée ;

— hémolyse totale dans les tubes 2, 3, 4 et 5 = alexinémie normale ;

— hémolyse totale dans les tubes 3, 4 et 5 = alexinémie diminuée ;

— hémolyse totale dans le tube 5 seulement = alexinémie très basse ;

— absence d'hémolyse dans tous les tubes = alexinémie nulle.

Ces dénominations sont en conformité avec les divers travaux faits sur le titre alexique des sérums ; purement qualitatives, elles nous paraissent préférables à l'emploi de chiffres conventionnels qui diffèrent d'un auteur à l'autre.

### Résultats des dosages d'alexine comparés aux taux de l'Euglobuline $I_1$.

Avec cette technique de dosage, nous avons repris en partie les études faites par R. Vargues sur l'alexinémie, en pratiquant en même temps sur les sérums une fiche réticulo-endothéliale et un dosage d'Euglobuline $I_1$.

| Numéro des sérums | Diagnostic | Alexinémie | Taux d'Eu. $I_1$ |
|---|---|---|---|
| 1 | Cirrhose | augmentée | 0,65 gr. |
| 2 | Tuberculose | augmentée | 0,50 » |
| 3 | Scarlatine | augmentée | 0,20 » |
| 4 | Cancer du poumon | normale | 0,50 » |
| 5 | Ictère | normale | 0,45 » |
| 6 | R.A.A. | normale | 0,60 » |
| 7 | Cancer | normale | 0,30 » |
| 8 | Pleurésie | normale | 0,60 » |
| 9 | Ulcère | normale | 0,35 » |
| 10 | Néphrose | normale | 0,70 » |
| 11 | Diabète — | normale | 0,50 » |
| 12 | Pleurésie | normale | 0,30 » |
| 13 | Leucémie | normale | 0,35 » |
| 14 | Tuberculose | normale | 0,50 » |
| 15 | Thalassémie | normale | 0,60 » |
| 16 | R.A.A. | normale | 0,65 » |
| 17 | Phlébite | normale | 0,35 » |
| 18 | Dermite | normale | 0,20 » |
| 19 | Epidermomycose | normale | 0,30 » |
| 20 | Cirrhose | normale | 0,60 » |
| 21 | Cirrhose | normale | 0,40 » |
| 22 | Cirrhose | normale | 0,35 » |
| 23 | Cirrhose | normale | 1,35 » |
| 24 | Cirrhose | normale | 1,60 » |
| 25 | Splénomégalie | normale | 2,20 » |
| 26 | Cirrhose | normale | 1,10 » |
| 27 | Cirrhose | normale | 1,00 » |
| 28 | Cirrhose | normale | 1,50 » |
| 29 | Cirrhose | diminuée | 1,15 » |
| 30 | Cirrhose | diminuée | 1,60 » |
| 31 | Splénomégalie | diminuée | 1,60 » |
| 32 | Cirrhose | nulle | 1,00 » |
| 33 | Cirrhose | nulle | 1,20 » |
| 34 | Cirrhose | nulle | 1,10 » |
| 35 | Cirrhose | nulle | 1,15 » |
| 36 | Cirrhose | nulle | 2,50 » |
| 37 | Cirrhose | nulle | 1,20 » |
| 38 | Cirrhose | nulle | 1,60 » |
| 39 | Brulé | nulle | 0,45 » |

L'examen des résultats donnés dans le tableau précédent permet les constatations suivantes :

1° Si nous mettons à part les sérums numérotés de 23 à 28 et le sérum 39, nous pouvons dire que le taux alexique et le titre de l'Euglobuline $I_1$ semblent en relation étroite : en effet, quand le taux d'Euglobuline $I_1$ est inférieur à 0,6 g par litre, le titre alexique est normal ou augmenté ; quand l'Euglobuline $I_1$ existe à un taux pathologique (supérieur à 0,6 g par litre) le titre de l'alexine est diminué ou nul.

2° Cependant, la relation entre le titre alexique et le taux de l'Euglobuline $I_1$ n'est pas une fonction simple, puisque l'alexinémie peut être nulle avec 1 g d'Euglobuline $I_1$, et seulement diminuée avec 2 g.

3° Mais surtout, les sérums 23, 24, 25, 26, 27 et 28 et le sérum 39 contredisent les conclusions précédentes. Le sérum 39 n'a pas d'alexine quoique le taux d'Euglobuline $I_1$ soit normal ; et les 6 autres sérums ont une alexinémie normale en même temps qu'un taux important d'Euglobuline $I_1$.

Cette étude systématique du titre alexique comparé au taux de l'Euglobuline $I_1$ aboutit par conséquent à une contradiction. Dans la majorité des cas, nos observations témoignent d'une relation entre le titre alexique et le taux de l'Euglobuline $I_1$, elles sont donc en accord avec les constatations expérimentales faites précédemment sur le pouvoir anticomplémentaire de l'Euglobuline $I_1$. Mais à côté de ces cas, il existe des exceptions dans lesquelles un titre alexique normal va de pair avec un taux anormal d'Euglobuline $I_1$. Il est donc nécessaire de pousser plus loin nos investigations pour expliquer ces résultats contradictoires.

**Les dosages paradoxaux d'alexine** (hémolyse en zone).

Dans 12 cas, les résultats de l'hémolyse sont paradoxaux. Dans le tube 1, il n'y a pas d'hémolyse. Celle-ci débute nettement dans le tube 2, est complète dans le tube 3, incomplète dans le tube 4 ; puis l'hémolyse est

nulle dans le tube 5. Par conséquent, une trop faible quantité de sérum et une trop forte quantité de sérum ne provoquent pas la lyse des hématies sensibilisées. Dans tous les cas, le taux de l'Euglobuline $I_1$ est augmenté.

| Numéro des sérums | Maladie | Alexinémie | Taux d'Euglobuline $I_1$ |
|---|---|---|---|
| 40 | Cirrhose | Zone | 1,8 grammes |
| 41 | Cirrhose | Zone | 1,3 » |
| 42 | Cirrhose | Zone | 1,2 » |
| 43 | Cirrhose | Zone | 0,8 » |
| 44 | Cirrhose | Zone | 1,0 » |
| 45 | Cirrhose | Zone | 1,1 » |
| 46 | Cirrhose | Zone | 1,3 » |
| 47 | Cirrhose | Zone | 1,3 » |
| 48 | Cirrhose | Zone | 1,2 » |
| 49 | Cirrhose | Zone | 1,8 » |
| 50 | Cirrhose | Zone | 1,0 » |
| 51 | Cirrhose | Zone | 2,3 » |

Ce phénomène de zone va nous permettre d'élucider les contradictions relevées dans les dosages précédents. En effet, l'hémolyse en zone met en évidence dans le même sérum deux phénomènes : 1° L'existence d'un pouvoir alexique normal puisque une dose de 0,2 cm3 de ces sérums suffit à déterminer la lyse des globules rouges sensibilisés ; 2° L'existence d'un pouvoir anticomplémentaire marqué, puisque la dose de 0,8 cm3 de sérum qui contient au moins 4 unités alexiques échoue à produire la lyse des globules rouges.

Ces deux activités peuvent être dissociées.

**Les sérums analexiques sont en même temps anti-complémentaires.**

Nous venons de voir que les sérums produisant une hémolyse paradoxale devaient posséder à la fois l'activité alexique et l'activité anticomplémentaire. Nous allons

montrer que l'absence de l'activité alexique d'un sérum s'accompagne d'une forte activité anticomplémentaire.

Si on utilise l'un quelconque des sérums ne produisant d'hémolyse dans aucun tube de réaction, et qu'on ajoute ce sérum à un mélange de globules rouges sensibilisés et de sérum frais alexique, l'hémolyse est empêchée.

Le même phénomène se produit aussi avec le sérum fournissant le phénomène d'hémolyse en zone.

Or, si avec l'un ou l'autre de ces types de sérums nous répétons la recherche du pouvoir anticomplémentaire après avoir supprimé par dialyse l'Euglobuline $I_1$, ce pouvoir anticomplémentaire disparaît.

Par conséquent, l'activité anticomplémentaire des sérums analexiques et des sérums donnant l'hémolyse paradoxale est due à la présence de l'Euglobuline $I_1$ dans ces sérums.

**Importance de la température dans les réactions de dosage de l'alexine.**

Les sérums fournissant le phénomène de zone contiennent donc deux substances antagonistes : d'une part, l'Euglobuline $I_1$ anticomplémentaire et, d'autre part, l'alexine.

Or, l'Euglobuline $I_1$ n'est anticomplémentaire qu'à des doses de l'ordre du milligramme. Elle ne pourra manifester son action que si la prise d'essai du sérum est suffisante. En outre, l'Euglobuline $I_1$ est encore cryoglobulinique et agglutinante à froid ; l'abaissement de la température doit donc favoriser son action.

D'autre part, l'alexine agit à des doses infimes (le poids de protéines alexiques serait de l'ordre de 0,5 g par litre de sérum, selon Pillemer et ses collaborateurs [40]). De plus, l'action de l'alexine a son optimum à 37°.

La différence d'activité de ces deux facteurs, selon la température du milieu, va nous permettre de dissocier les deux activités.

1° Si on étudie un sérum produisant le phénomène de zone et si on prend soin d'effectuer entièrement la réaction de dosage d'alexine à 37°, la zone disparaît et l'hémolyse est totale dans tous les tubes de réaction. Pour obtenir la suppression de la zone, il faut, préalablement, placer tous les réactifs globules rouges, sérum hémolytique, eau physiologique et sérum à étudier à 37° ; il faut aussi chauffer les tubes et les pipettes à 37°. Les exemples suivants illustrent ce phénomène :

| | Mélange effectué à | Quantité de sérum utilisée dans chaque tube 0,1 | 0,2 | 0,4 | 0,6 | 0,8 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Sérum A | 20° | 0 | ++ | +++ | ++ | 0 |
| | 37° | 0 | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Sérum B | 20° | + | +++ | +++ | ++ | 0 |
| | 37° | ++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Sérum C | 20° | ++ | +++ | +++ | ++ | 0 |
| | 37° | ++ | +++ | +++ | +++ | +++ |

2° En opérant de la mêne manière, on peut mettre en évidence l'alexine avec des sérums apparemment analexiques.

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Sérum D | réaction normale | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | réaction à 37° .. | 0 | 0 | ++ | +++ | +++ |

3° Inversement, on peut empêcher l'hémolyse par des sérums riches en Euglobuline $I_1$ présentant une réaction de dosage normale (sérums 23, 24, 25, 26, 27 et 28). Il suffit d'opérer avec des réactifs préalablement refroidis à + 4°. On obtient soit une absence totale de l'hémolyse, soit une hémolyse en zone quand les mélanges sont portés à l'étuve à 37°.

**L'Euglobuline $I_1$, anti-complémentaire, masque l'activité alexique.**

De toutes les expériences précédentes, il semble se dégager que l'Euglobuline $I_1$ agit en bloquant les récepteurs des anticorps correspondant à l'alexine. Les glo-

bules rouges sensibilisés seraient entourés, à basse température, d'une couche d'Euglobuline $I_1$, couche qui masquerait les groupes complémentophiles.

Les expériences suivantes confirment cette hypothèse.

On prépare :

1° Une suspension de globules rouges lavés ; à cette suspension, on ajoute un volume égal de sérum hémolytique afin de sensibiliser les globules.

2° Une partie de cette suspension sensibilisée est maintenue trente minutes à l'étuve à 37° puis elle est centrifugée. On effectue un lavage à l'eau physiologique puis on remet les globules en suspension.

3° Ces globules sensibilisés, privés de sérum hémolytique, sont mis en contact avec un sérum riche en Euglobuline $I_1$ ; le mélange est porté à + 4° pendant 1 heure puis centrifugé et lavé à froid pour éliminer le sérum ajouté. Les globules rouges ainsi traités sont remis en suspension dans de l'eau physiologique.

A 1 cm3 de chacune de ces trois préparations, on ajoute 1 cm3 d'une dilution de sérum frais contenant deux unités alexiques. On porte les tubes à 37° pendant 1/2 heure. L'hémolyse est totale avec les globules rouges des préparations I et II, il n'y a pas d'hémolyse de la préparation III.

Par conséquent, dans la préparation III, l'Euglobuline $I_1$ a bloqué le récepteur de l'alexine.

**Discussion.**

Nos expériences démontrent que dans certains sérums il doit exister deux pouvoirs antagonistes : le pouvoir alexique d'une part, et le pouvoir anticomplémentaire dû à l'Euglobuline $I_1$ d'autre part. Selon les conditions de la réaction, l'une ou l'autre de ces propriétés se manifestera. Si le mélange des réactifs est effectué à haute température, l'action anticomplémentaire n'apparaîtra pas, l'hémolyse aura lieu normalement. Si, au

contraire, le mélange des réactifs est fait à basse température (ce qui est le cas dans les mois d'hiver), l'Euglobuline $I_1$ se fixe sur les globules rouges sensibilisés et bloque les groupes complémentophiles des hémolysines. Dans certains cas, les deux phénomènes se réalisent dans une même réaction ; on a une hémolyse paradoxale en zone.

En opérant soigneusement à 37°, nous n'avons plus trouvé de sérum analexique. Par conséquent, le pouvoir anticomplémentaire dû à l'Euglobuline $I_1$ suffit à expliquer l'absence d'hémolyse observée dans nos dosages. On comprend aussi pourquoi c'est justement ce chaînon globulinique C'1 qui semblait faire défaut dans les sérums de paludéens.

Par conséquent, tout dosage de l'alexinémie devra être pratiqué ou tout au moins contrôlé en effectuant le mélange des réactifs à 37°. En même temps, il faudra préciser le taux de l'Euglobuline $I_1$. Quand on aura ainsi éliminé l'action anticomplémentaire thermolabile, on devra encore rechercher l'action anticomplémentaire du sérum chauffé. Si ces différentes activités anticomplémentaires n'existent pas dans le sérum et que celui-ci ne provoque cependant pas l'hémolyse, on pourra conclure à l'absence d'alexine. (Le sérum N° 39 de notre étude semble appartenir à ce type.) Dans le cas contraire, l'absence d'alexine n'est qu'apparente ; l'alexine est seulement masquée, et les variations alexiques observées ne sont en réalité que les variations du pouvoir anticomplémentaire du sérum et plus particulièrement les variations du taux de l'Euglobuline $I_1$.

**Résumé.**

Les observations et les expériences précédentes démontrent que l'Euglobuline $I_1$ des sérums peut exercer son pouvoir anticomplémentaire vis-à-vis de l'alexine propre de ces sérums et fausser, par conséquent, les dosages de l'alexinémie.

Deux facteurs interviennent pour que se manifeste cette propriété:

1° la quantité d'Euglobuline $I_1$ : si cette protéine a un taux sérique inférieur à 0,6 g par litre (sérums normaux), le pouvoir anticomplémentaire n'apparaît pas. Si le taux est anormal, ce pouvoir peut apparaître.

2° la température à laquelle est effectuée le mélange des réactifs : à basse température ou même à température ambiante, l'Euglobuline $I_1$ agit plus rapidement que l'alexine et se fixe sur les hématies sensibilisées, en masquant le groupement complémentophile de l'anticorps. A 37°, seule l'alexine agit ; le pouvoir anticomplémentaire de l'Euglobuline $I_1$ n'apparaît pas.

L'action de ces deux facteurs permet d'expliquer les contradictions relevées entre le titre apparent de l'alexine et le taux de l'Euglobuline $I_1$ ; elle donne la réponse au problème posé par certains sérums donnant des réactions paradoxales (hémolyse en zone).

## CONCLUSIONS SUR LE ROLE DE L'EUGLOBULINE $I_1$ EN IMMUNOLOGIE NON SPÉCIFIQUE

Les études rapportées dans ce chapitre montrent donc diverses activités de l'Euglobuline $I_1$. Celle-ci, en effet, manifeste des actions cryoglobuliniques, hémagglutinantes à froid et anticomplémentaires. Ces actions sont les propriétés non seulement des solutions pures d'Euglobuline $I_1$, mais encore des sérums riches en Euglobuline $I_1$. Dans de tels sérums, les effets que nous avons cités disparaissent en même temps qu'on élimine l'Euglobuline $I_1$ par dialyse ou par chauffage du sérum à 56°.

Ces diverses activités de l'Euglobuline $I_1$ sont remarquables par leur absence de spécificité. En effet, on les retrouve dans des maladies aussi différentes que les cirrhoses du foie, les myélomes multiples, le kala-azar ou l'endocardite d'Osler. D'autre part, dans ces réactions, l'Euglobuline $I_1$ n'entre pas en jeu de façon spécifique, c'est-à-dire en agissant par des récepteurs spécifiques vis-à-vis des hématies ou de l'alexine, mais seules semblent intervenir les propriétés de faible solubilité de l'Euglobuline $I_1$.

En effet, ces différentes activités sont directement reliées les unes aux autres. Le schéma de la page 80 illustre ces activités. Deux notions conditionnent ces propriétés de l'Euglobuline $I_1$ : 1° sa faible solubilité à basse température ; 2° son aptitude à s'adsorber soit sur des molécules identiques à elle-même (précipitation à froid), soit à des globules rouges.

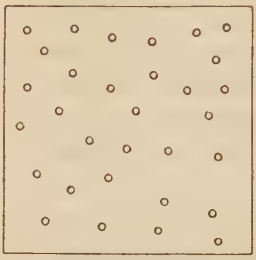
Le phénomène le plus simple à schématiser est celui de la précipitation à froid : à 37°, les molécules d'Euglobuline $I_1$ sont hydrophiles et réparties uniformément dans le sérum. Quand la température s'abaisse, la solubilité diminue, les molécules se groupent en petits amas qui ne sédimentent pas mais qui donnent un aspect laiteux à la solution. A basse température, les amas se rejoignent et l'Euglobuline $I_1$ décante. Ces phénomènes sont surtout nets dans les solutions pures d'Euglobuline $I_1$ ; dans les sérums, les liaisons de l'Euglobuline $I_1$ avec d'autres protéines semblent augmenter sa solubilité.

Quand les sérums riches en Euglobuline $I_1$ ou des solutions d'Euglobuline $I_1$ sont additionnées de globules rouges, la dispersion des globules et des molécules d'Euglobuline $I_1$ est satisfaisante à 37° ; si la température s'abaisse, les molécules d'Euglobuline $I_1$ s'adsorbent sur les hématies en même temps que d'autres molécules se rassemblent en petits amas comme dans le premier schéma. La température s'abaissant encore, l'agrégation des molécules s'accentue et entraîne l'agglutination lâche des hématies, c'est l'hémagglutination froide.

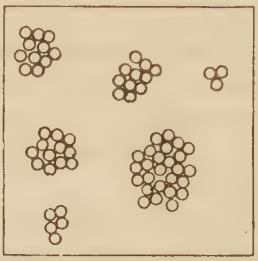
Enfin, notre troisième schéma représente l'action anticomplémentaire de l'Euglobuline $I_1$. Les globules rouges sont préalablement sensibilisés ; chaque globule porte donc une molécule anticorps, le récepteur antigénique de cet anticorps est saturé par la surface globulaire, son récepteur alexique ou complémentophile est libre. Si on ajoute à une telle préparation un mélange d'alexine et d'Euglobuline $I_1$, deux phénomènes pourront se produire : à 37°, l'Euglobuline $I_1$ reste soluble et bien dispersée, tandis que l'alexine, très active à cette température, se fixe énergiquement sur les groupements complémento-

# PROPRIETES de L'EUGLOBULINE I,

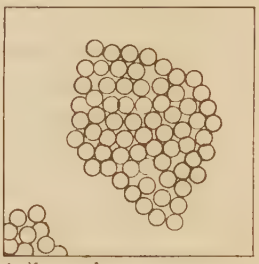
1°/ Precipitations a froid (cryoglobuline)



A 37° les molécules de l'Euglobuline sont libres

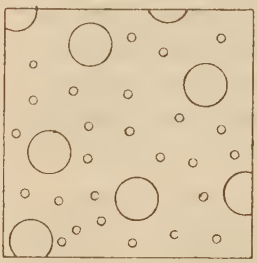


Quand la temperature s'abaisse les molécules deviennent hydrophiles et s'accolent

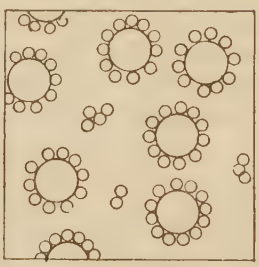


A +4° on observe la precipitation de l'Euglobuline $I_1$

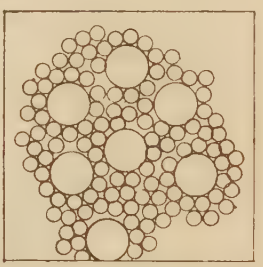
2°/ Hemagglutination à froid



A 37° hématies et molécules d'Euglobuline $I_1$ sont libres

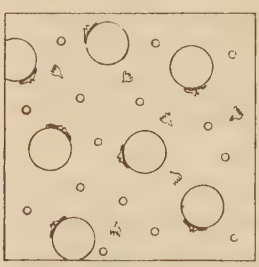


Quand la temperature s'abaisse les molecules d'Euglobuline $I_1$ s'accolent sur les globules rouges

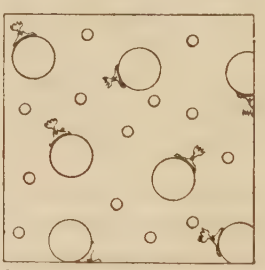


A +4° la précipitation de l'Euglobuline $I_1$ entraine la prise en masse des hématies

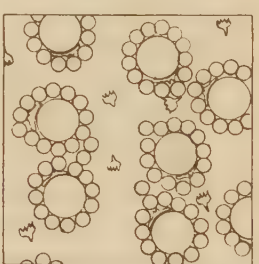
3°/ Pouvoir anti complementaire



Des hématies sensibilisées sont mises en présence d'alexine et d'Euglobuline $I_1$



A 37° l'alexine se fixe et détermine la lyse



A +4° l'Euglobuline $I_1$ se fixe et masque les groupes complementophiles

## Légende

- Euglobuline $I_1$ a 37°
- Euglobuline $I_1$ a +4°
- Globules rouges
- Globules rouges sensibilisés
- Sensibilisatrice avec son recepteur globulaire et son recepteur alexique
- Alexine avec son recepteur de la sensibilisatrice
- Globules rouges lysés
- Globules rouges avec sensibilisatrice masquée par l'Euglobuline $I_1$

philes, la lyse se produit ; à basse température, au contraire, l'Euglobuline $I_1$ manifeste ses propriétés de faible solubilité ; elle se fixe sur les hématies sensibilisées et masque le groupement complémentophile ; si la température s'élève assez pour que l'alexine puisse manifester son action, celle-ci ne trouve plus de groupements complémentophiles apparents, elle reste libre et l'hémolyse ne se produit pas.

Tous ces phénomènes sont réversibles quand on passe des basses températures à la température de 37°.

Selon notre hypothèse illustrée par nos schémas, les diverses actions de l'Euglobuline $I_1$ s'interprètent aisément par le seul caractère physique de solubilité ; elle n'exige pas la présence de récepteurs spécifiques. L'Euglobuline $I_1$ n'apparaît ni comme un auto-anticorps qui serait spécifique des hématies humaines, ni comme une anti-alexine spécifique.

Insistons encore sur un point important : l'Euglobuline $I_1$ est à la fois cryoglobuline, agglutinine froide et anti-alexine, mais il n'est pas prouvé par nos recherches que les activités cryo-globuliniques, agglutinantes à froid et anticomplémentaires soient toujours dues à l'Euglobuline $I_1$.

## EUGLOBULINE $I_1$ ET ANTICORPS SPÉCIFIQUES

L'Euglobuline $I_1$, définie comme la fraction protidique précipitant à pH 7,4, après raréfaction des électrolytes, possède dans certains cas des propriétés immunologiques spécifiques, et se comporte donc comme un véritable anticorps. Ce problème a été surtout étudié par Sandor (26). Cet auteur montre d'abord une relation étroite entre les taux d'Euglobuline $I_1$ et le titre des agglutinines dans certains sérums de chevaux hyperimmunisés (antipesteux, antiméningococciques, antipneumococciques). Il constate ensuite que le pouvoir agglutinant se retrouve presque entièrement dans la fraction euglobulinique $I_1$ et que les autres euglobulines et les pseudo-globulines ne contiennent pas d'agglutinines spécifiques.

Nous avons constaté des faits identiques avec les sérums antipesteux que nous avons étudiés. Nos sérums agglutinaient le bacille pesteux, au 1/2.000. Cette agglutination disparaissait après chauffage à 56° pendant 24 heures, en même temps que disparaissait l'Euglobuline $I_1$. Les préparations d'Euglobuline $I_1$ possédaient un pouvoir agglutinant identique à celui des sérums.

Par conséquent, chez les chevaux hyper-immunisés contre les bactéries par voie intraveineuse, l'anticorps spécifique se trouve dans la fraction thermolabile $I_1$. Le chauffage du sérum (ou encore l'addition de formol) supprime l'action agglutinante. Dans ces cas, l'Euglobuline $I_1$ joue bien le rôle des anticorps spécifiques classiques tout en étant détruite par le chauffage à 56°.

Chez l'Homme, on peut noter que l'Euglobuline $I_1$ apparaît en quantité notable uniquement dans des maladies qui s'accompagnent d'une immunité faible ou qui ne s'accompagnent d'aucun état immunitaire. Inversement, dans les maladies déterminant une forte immunité (typhus, fièvre typhoïde), les taux d'Euglobuline $I_1$ sont peu importants. Les plus fortes doses d'Euglobuline $I_1$ se rencontrent dans les parasitoses (trypanosomiase, leichmaniose, paludisme), maladies dans lesquelles l'immunité est très faible et la production d'anticorps minime. Dans les cirrhoses du foie, on trouve des taux d'Euglobuline $I_1$ de l'ordre de 1 à 3 grammes par litre sans qu'il y ait eu stimulation antigénique. Enfin, l'Euglobuline $I_1$ apparaît dans les septicémies bactériennes lentes (endocardite d'Osler, par exemple), maladies remarquables par l'absence d'immunité. Par conséquent, chez l'Homme, l'Euglobuline $I_1$ ne semble pas douée de propriétés antigéniques spécifiques. Cependant, Sandor (41) signale qu'une petite partie des agglutinines antiéberthiennes des malades atteints de fièvre thyphoïde se retrouve dans la fraction $I_1$. La majeure partie de ces agglutinines se situant dans les euglobulines précipitées à pH 5,9.

Notons enfin que l'animal de choix pour la préparation expérimentale des sérums-anticorps, le Lapin, ne produit jamais d'Euglobuline comparable à l'Euglobuline $I_1$.

## EUGLOBULINE $I_1$ ET RÉACTIONS SÉRIQUES NON SPÉCIFIQUES

Cette étude a fait l'objet de recherches au Laboratoire de Bactériologie, recherches exposées dans la thèse de L. Schembri (10). Afin de donner une vue complète des propriétés de l'Euglobuline $I_1$, nous résumerons rapidement les résultats de ces études.

1° L'Euglobuline $I_1$ intervient directement et intervient seule dans les « *réactions à l'eau distillée* » (réactions de Sia par exemple). En effet, ces réactions constituent une simple dilution du sérum dans l'eau. Si l'eau est convenablement distillée, le pH de la dilution sérique est exactement celui du sérum, c'est-à-dire 7,4 ; on se trouve donc dans les conditions de précipitation de l'Euglobuline $I_1$. Si l'eau distillée est mal préparée (eau distillée acide contenant encore une quantité notable d'électrolytes), le pH de la dilution sérique sera acide, et tout sérum, normal ou anormal, fournira un précipité euglobulinique (fausse réaction positive).

2° L'Euglobuline $I_1$ intervient encore directement dans la *réaction de Kunkel*. Cette réaction utilise de l'eau distillée tamponnée à pH 7,8 avec un tampon organique (véronal) qui n'augmente pas la force ionique ; l'addition à ce tampon d'une très faible quantité de sulfate de zinc (0,024 g par litre) modifie à peine cette force ionique. Le test de Kunkel ne semble être qu'un test à l'eau distillée mais, alors que le précipité fourni dans le test à l'eau distillée, contient uniquement une $\gamma$ -globuline, le précipité du test de Kunkel fournit de petites quantités d'$\alpha$ et de $\beta$ -globulines en même temps que les $\gamma$ -globulines.

3° L'Euglobuline $I_1$ coprécipite avec des $\beta$ -globulines dans *la réaction de Mac Lagan* (42). Cette réaction met encore en jeu la raréfaction des électrolytes. Au pH du réactif de Mac Lagan (7,8) précipite seulement l'Euglobuline $I_1$, qui se combine alors avec le thymol : la molécule protidique se trouve hérissée de noyaux benzéniques paraffines qui attirent les graisses fixées sur les $\beta$ -globulines, et un complexe protido-protidique précipite.

Cette co-précipitation des γ et des β -globulines explique pourquoi certains auteurs ont admis à tort que la réaction de Mac Lagan était spécifique des lipo-globulines. En fait, cette réaction n'est qu'une simple réaction de précipitation dans l'eau distillée grossie quantitativement par la co-précipitation de protéines sériques de point isoélectrique inférieur au pH auquel s'effectue la réaction.

4° L'Euglobuline $I_1$ se combine avec le réactif céphaline-cholestérol (improprement appelé antigène) dans *la réaction de Hanger* (43). La formation de ce complexe artificiel lipo-protidique est sous la dépendance étroite du pH auquel est effectuée la réaction : il s'agit d'une liaison hétéro-polaire entre substances portant des charges électriques contraires. Dans les conditions normales de la réaction de Hanger, seule peut intervenir une protéine chargée positivement ; l'Euglobuline $I_1$ est la seule protéine qui réponde à cette exigence.

5° L'Euglobuline $I_1$ conditionne encore la positivité de *la réaction de Gaté* (formol-gélification). Cette réaction s'explique facilement si on tient compte du pH auquel s'effectue le test. Sous l'action du formol, le système protidique sérique se trouve remanié, l'aldehyde formique lie les protéines entre elles par des ponts méthyléniques. Il se forme des micelles dont le point isoélectrique est la moyenne entre les points isoélectriques des diverses protéines. La présence de fortes proportions de globulines de point isoélectrique élevé du type de l'Euglobuline $I_1$, élève le point isoélectrique des micelles et conditionne la prise en gel dans les conditions de pH auquel s'effectue la réaction de Gaté.

Les expériences de R. Vargues et L. Schembri montrent encore que ces différentes réactions peuvent être obtenues positives ou négatives avec des sérums normaux ou anormaux ; il suffit de faire varier le pH par un léger apport de base ou d'acide dans le tube de réaction. De plus, l'extraction de l'Euglobuline $I_1$ par simple dialyse à pH 7,4 rend négatifs les sérums qui fournissent des réactions positives. Inversement, l'addition d'Euglobu-

line $I_1$ à un sérum normal permet d'obtenir des résultats positifs avec l'une quelconque des précédentes réactions.

En conclusion de leur étude sur les réactions sériques « non spécifiques », R. Vargues et L. Schembri proposent de remplacer ces réactions par l'étude complète du système euglobulinique au moyen de la fiche réticulo-endothéliale. Cette technique fournit en effet des renseignements sur les α et β -euglobulines en même temps qu'elle dose l'Euglobuline $I_1$.

# CHAPITRE V

## PHYSIO-PATHOLOGIE DE L'EUGLOBULINE $I_1$

Dans ce chapitre, nous allons étudier successivement le caractère physiologique de l'Euglobuline $I_1$, son origine, les variations normales ou morbides du taux sérique de cette protéine. Puis, à l'aide des faits d'observation et d'expérience, nous essayerons de discuter du rôle physiopathologique de l'Euglobuline $I_1$.

### Caractères physiologiques de l'Euglobuline $I_1$.

Dans la définition de l'Euglobuline $I_1$ donnée par Sandor, celui-ci insiste sur le caractère pathologique anormal de cette protéine. En effet, les diverses propriétés de l'Euglobuline $I_1$ la distingue remarquablement des autres globulines sériques : sa solubilité est très faible, son point isoélectrique très élevé, sa vitesse électrophorétique très lente. De plus, elle possède des propriétés biologiques nettement anormales telles que son activité agglutinante à froid, son pouvoir anticomplémentaire.

La question envisagée ici est de déterminer si l'Euglobuline $I_1$ existe seulement dans les sérums pathologiques et si elle fait totalement défaut dans les sérums de sujets sains.

1° Dans les sérums normaux on trouve toujours une petite quantité de protéines précipitables à pH 7,4 dans les solutions de faible force ionique. Sandor admet qu'un sérum normal peut contenir 0,6 g de cette protéine par litre. Or, cette protéine répond à la préparation de l'Euglobuline $I_1$.

2° Dans tout tracé électrophorétique de sérum normal, la surface occupée par les γ -globulines comprend toujours la région où se situe l'Euglobuline $I_1$ (γ -globuline lente).

3° Selon Dacie (31) et de nombreux auteurs, tous les sérums posséderaient une certaine quantité d'agglutinines froides, le taux normal de ces agglutinines pouvant atteindre 1/64 avec des techniques très sensibles.

4° Tout sérum possède un léger pouvoir anticomplémentaire. Ce pouvoir est manifeste dans les sérums normaux privés de leur alexine par vieillissement ; il existe déjà dans les sérums frais (44).

Par conséquent, il semble bien que les diverses propriétés de l'Euglobuline $I_1$ se retrouvent dans les sérums normaux. D'ailleurs, si on admet avec Sandor que l'Euglobuline $I_1$ est en rapport avec l'activité macrophagique et le fonctionnement du réticulo-endothélium, il est logique de penser que ces mécanismes fonctionnant chez l'homme sain, normal, la traduction humorale de ce fonctionnement, c'est-à-dire l'Euglobuline $I_1$, doit se retrouver chez ce sujet normal.

Le caractère pathologique, anormal des sérums riches en Euglobuline $I_1$ ne résulterait donc pas de l'apparition dans le sérum d'une substance qualitativement différente des globulines normales, mais seulement de l'exagération quantitative d'un processus normal.

**Origine de l'Euglobuline $I_1$.**

Les études précédentes montrent que l'Euglobuline $I_1$ possède des propriétés physiques, chimiques et biologiques nettement définies. Pour être complète, la définition de l'Euglobuline $I_1$ doit comporter des renseignements sur l'origine de cette protéine sérique.

Sandor lui assigne une origine macrophagique :

« Les conditions dans lesquelles cette protéine appa-
« raît dans les sérums, sont précises. Il en est ainsi chez
« le cheval, surtout lors des inoculations intraveineuses
« avec certaines bactéries... Le taux de l'Euglobuline $I_1$,

« insignifiant chez l'homme normal, augmente considé-
« rablement lors des infections qui touchent directement
« le tissu hépatique, et modérément dans toutes les affec-
« tions septiques. Or, dans toutes ces conditions, des
« antigènes entrent en contact directement et d'une ma-
« nière quasi exclusive avec les systèmes macrophagiques
« puissants du foie et de la rate. Les macrophages qui
« phagocytent des antigènes désagrègent une partie de leur
« protoplasma par le processus de clasmatocytose connu
« depuis Ranvier. Il y a donc lieu de croire que l'Euglo-
« buline $I_1$, qui apparaît dans toutes les conditions où la
« clasmatocytose des macrophages est excitée, n'est autre
« que le protoplasma des macrophages ainsi désagré-
« gés. » (2-3).

Les arguments en faveur de l'origine macrophagique ou mieux encore mésenchymenteuse ou réticulo-endothéliale, sont les suivants :

1° Les maladies provoquant la production de quantités importantes d'Euglobuline $I_1$ sont caractérisées anatomiquement par une hyperplasie du système réticulo-endothélial et plus précisément du système macrophagique (parasitose, hyperplasie kupférienne des cirrhoses...) (46).

2° Expérimentalement, R. Vargues (45-47) a montré que le blocage de la réaction macrophagique par de fortes doses de cortisone entraîne l'inhibition de la production de l'Euglobuline $I_1$.

3° L'excitation du système macrophagique chez le Rat par *Plasmodium berghei* entraîne la production accrue d'Euglobuline $I_1$. S. Hadjerès (48) a même pu préciser le parallélisme étroit existant entre l'hyperplasie réticulaire splénique mesurée par des histogrammes et le taux sérique de l'Euglobuline $I_1$.

Nous admettons donc avec Sandor l'origine macrophagique ou mieux mésenchymenteuse de l'Euglobuline $I_1$. Cependant, une telle origine sera confirmée seulement par l'isolement de l'Euglobuline à partir des éléments du système réticulo-endothlial. Les essais faits

dans ce sens au Laboratoire de Bactériologie ont jusqu'à présent échoués.

**Variations physio-pathologiques du taux de l'Euglobuline $I_1$.**

On a été conduit à considérer l'Euglobuline $I_1$ comme une protéine existant dans tout sérum normal ; le taux de cette Euglobuline augmente considérablement dans certains états pathologiques. Dans ces maladies, les propriétés spéciales de l'Euglobuline $I_1$ se manifestent pleinement.

Quelques données concernant le taux physiologique de l'Euglobuline $I_1$ chez les sujets normaux ont été recueillies.

L'enfant, à sa naissance, présente très peu d'Euglobuline $I_1$, moins de 0,1 mg par litre de sérum, selon les dosages opacimétriques rapportés (49). Ce faible taux se conçoit si on estime que le système macrophagique du nouveau-né n'a pas encore eu à manifester son action.

Un point important relatif à l'Euglobuline $I_1$ du nouveau-né a été signalé. *L'Euglobuline $I_1$ ne traverse pas la barrière placentaire.* En effet, dans plusieurs cas, A. Guiraud a noté un taux d'Euglobuline $I_1$ élevé (de 1 à 5 g) chez des femmes enceintes paludéennes. Or, les enfants nés de ces femmes présentaient un taux normal d'Euglobuline $I_1$ (de l'ordre de 0,1 g par litre). Ces dosages chimiques rejoignent les constatations faites au sujet des agglutinines froides qui ne traversent pas le placenta.

Entre le troisième et le sixième mois de la vie, le taux de l'Euglobuline $I_1$ atteint des valeurs comparables à celles de l'adulte. Ce taux se maintiendra toute la vie, et se retrouve identique chez les vieillards.

Seules des circonstances pathologiques pourront modifier le taux de l'Euglobuline $I_1$. Le plus souvent, on rencontrera une augmentation de ce taux résultant d'une irritation pathologique du système réticulo-endothélial. Cette augmentation pourra être transitoire ou chronique. En effet, chez certains sujets, l'augmentation observée dure peu de temps (2 semaines), il s'agit de malades

atteints de paludisme aigu le plus souvent. Dans d'autres cas, l'hyper-euglobulinémie $I_1$ est tenace et se prolonge pendant des mois (maladies chroniques telles que trypanosomiase, kala-azar). Enfin, dans les cirrhoses, le taux élevé de l'Euglobuline $I_1$ ne rétrocède pas.

La clinique révèle parfois des abaissements du taux de l'Euglobuline $I_1$ ; le fait a été observé dans des brûlures graves, dans l'éclampsie et résulte vraisemblablement du blocage du système réticulo-endothélial ; enfin, certains syndromes néphrotiques sont remarquables par l'absence quasi totale d'Euglobuline $I_1$.

**Rôle physio-pathologique de l'Euglobuline $I_1$.**

Les propriétés de l'Euglobuline $I_1$ que nous avons décrites au cours de notre étude concernent surtout le comportement *in vitro* de cette protéine ; il est en effet plus aisé d'analyser l'action d'une substance dans une réaction que de déterminer l'activité de cette même substance dans les humeurs mêmes de l'organisme. De plus, une expérimentation concernant le rôle physio-pathologique de l'Euglobuline $I_1$ exige de grandes quantités de cette protéine. Cependant, un corps tel que l'Euglobuline $I_1$, qui est produit en quantité parfois considérable dans certains états pathologiques, doit jouer un rôle physio-pathologique non négligeable à priori.

Les recherches sur l'Euglobuline $I_1$ ne sont pas encore assez avancées pour qu'on puisse donner des conclusions fermes. Dans ce paragraphe, les hypothèses joueront un rôle plus important que les faits expérimentaux.

Il est possible que l'Euglobuline $I_1$ agisse à la fois dans les phénomènes de défense de l'organisme et dans la pathogénie de certains symptômes morbides.

1° *Dans les phénomènes de défense,* l'Euglobuline $I_1$ pourrait intervenir dans la phagocytose des germes par les macrophages. En effet, les taux massifs d'Euglobuline $I_1$ s'observent dans les parasitoses sanguicoles (paludisme et maladie du sommeil) et dans le kala-azar, maladies dans lesquelles la phagocytose est intense et

constitue le mode de défense apparemment le plus efficace. On peut supposer que l'Euglobuline $I_1$ favoriserait l'action des macrophages en opsonisant les parasites. Cette opsonisation serait non spécifique, puisque dans ces affections l'Euglobuline $I_1$ ne paraît pas douée de propriétés anticorps spécifiques. Grâce à ses propriétés de solubilité faible et d'adsorption facile, l'Euglobuline $I_1$ se fixerait sur les parasites et les enroberait. Or, selon Sandor (2-3), l'Euglobuline $I_1$ n'est autre que le protoplasme désagrégé des macrophages. Par conséquent, le parasite, recouvert d'un film superficiel d'Euglobuline $I_1$, serait une proie facile pour le phagocyte.

2° L'Euglobuline $I_1$ peut jouer un rôle dans *la pathogénie de symptômes morbides.*

*a*) *Anémie :* Toutes les maladies s'accompagnant de quantités notables d'Euglobuline $I_1$ sont des maladies anémiantes (parasitoses, cirrhoses, splénomégalies chroniques, septicémies bactériennes lentes...) Expérimentalement, R. Vargues avec M. Zermati (34) a observé que l'inoculation à l'animal (rat et lapin) d'Euglobuline $I_1$, entraîne une anémie légère mais suffisante pour déclancher une crise réticulocytaire modérée. L'anémie pourrait avoir deux origines distinctes : ou bien le refroidissement des extrémités permettrait à l'Euglobuline $I_1$ de jouer *in vivo* son rôle d'agglutinine froide, l'agglutination se poursuivant par la lyse des globules ; ou bien, l'anémie proviendrait d'une hémophagocytose : l'Euglobuline $I_1$ se fixerait indifféremment sur les parasites (ou sur les hématies parasitées du paludisme) et sur les globules rouges normaux et opsoniserait ainsi ces globules à l'action macrophagique.

*b*) D'autres signes cliniques tels que l'acrocyanose, le purpura dû au froid, les hémorragies muqueuses, peuvent peut-être avoir pour cause la faible solubilité à froid de l'Euglobuline $I_1$.

Par conséquent, l'Euglobuline $I_1$ aurait à la fois un rôle bénéfique (défense de l'organisme) et un rôle défavorable (anémie...). Ce second rôle confirmerait l'aspect « pathologique » de cette protéine.

# CHAPITRE VI

## GLOBULINES VOISINES DE L'EUGLOBULINE $I_1$

Depuis quelques années, certains auteurs se sont attachés à l'étude du fractionnement des globulines sériques. Ce fractionnement leur a permis de mettre en évidence certains groupes de globulines, euglobulines ou pseudoglobulines, auxquels ils ont rattaché telle ou telle propriété physique, chimique ou immunologique. Les méthodes de fractionnement n'étant pas les mêmes, les divers auteurs ont abouti à des fractions différentes. Parmi les fractions décrites, certaines semblent se rapprocher de l'Euglobuline $I_1$ de Sandor.

Felton (1), le premier, en 1928, a montré qu'une certaine euglobuline supporte les anticorps précipitants, agglutinants et opsonisants du sérum antipneumococcique de cheval. Cette euglobuline de Felton aurait un optimum de précipitabilité isoélectrique pour un pH très alcalin (pH = 7). Ce fait fut confirmé plus tard par Reiner et Reiner. Support des précipitines-agglutinines, pHi alcalin, voilà deux propriétés de l'euglobuline de Felton, que Sandor retrouve pour l'Euglobuline $I_1$. Il est dommage que nous n'ayons pas eu d'autres précisions sur cette euglobuline pour savoir jusqu'où va leur similitude.

Doladilhe (50), en 1936, avec Charpentier, décrit également une euglobuline, dite « protéine visqueuse ». Cette protéine visqueuse a été reconnue par ces auteurs comme étant le support des précipitines-agglutinines ; Doladilhe, dans un article suivant, remarque que sa protéine visqueuse précipite à un pH alcalin, mais cet auteur ne donne jamais le pH de précipitation. Il ne nous

est donc pas permis de faire, avec si peu de précisions, un rapprochement avec l'Euglobuline $I_1$.

Hewitt (51), en 1938, fractionne isoélectriquement le sérum après l'avoir porté à 50 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium. Les protéines qui ont précipité, sont remises en solution et amenées à des pH divers ; à pH=7 précipite une euglobuline qu'Hewitt appelle Eu I ; à pH=6 précipite l'Eu II ; en solution reste une pseudo-globuline. Les fractions obtenues ne sont pas pures. L'Eu I d'Hewitt, qui semble proche de l'Euglobuline $I_1$ de Sandor, contiendrait des $\gamma$ et des $\beta$ -globulines. L'auteur rapproche son Eu II, obtenue sous forme semi-liquide, de la protéine visqueuse de Doladhile. Ces diverses fractions globulinémiques n'ont pas été retrouvées par d'autres chercheurs utilisant la méthode donnée.

Green, Mc Khann, Kapnick et Fahey (52) décrivent, en 1939, une $\gamma$ -euglobuline exceptionnelle n'existant que dans les sérums antipneumococciques de cheval, qui supporte l'anticorps et dont le point isoélectrique se situe à pH=7 ; mais cette étude n'ayant pas été poursuivie, à notre connaissance, les autres caractères ne nous sont pas connus. Son pHi est identique à celui que nous avons donné pour l'Euglobuline $I_1$ de Sandor dans le présent travail ; c'est la seule constatation que nous pouvons faire. Green (53) avait donné en 1938 le fractionnement des euglobulines et leur avait donné les noms de P I, P II, P III ; la fraction P III correspond à la fraction I de Sandor.

Cette même année de 1939, Kabat (54) décrit dans le sérum antipneumococcique de cheval une euglobuline « composant lourd » ; elle fut appelée « globuline lourde de Kabat ». Cet auteur la considère comme étant le support d'anticorps, mais non uniquement composée d'anticorps.

H. Bierry (55), en 1942, précipite les euglobulines sériques à l'aide d'un courant de CO2. Il obtient un précipité représentant le mélange d'euglobulines voisines. Il sépare ensuite ce mélange en plusieurs fractions grâce à leur solubilité différente. Il prépare ainsi quatre fractions

qu'il appelle Eu I, Eu II, Eu III, Eu IV. De ces fractions, « Eu II » semble être proche de l'Euglobuline $I_1$ de Sandor. Bierry la décrit comme étant une masse translucide, semi-liquide, d'aspect gélatineux, sorte de gel colloïdal. Cette euglobuline précipite par une solution à demi saturation de sulfate d'ammonium. Elle subit un début de dénaturation quand on la porte à l'étuve à 105° (en particulier diminution de la solubilité et changement du pouvoir rotatoire). L'auteur appelle cette euglobuline « euglobuline gélifiable », marquant ainsi sa facilité à prendre la forme de gel. Comme l'Euglobuline $I_1$ de Sandor, l'euglobuline gélifiable de Bierry est visqueuse, insoluble dans l'eau distillée et a une teneur en glucides peu élevée.

A.B. Lerner et G.R. Greenberg (56) décrivent, en 1946, une cryoprotéine précipitant spontanément d'un sérum d'un malade atteint de glomérulonéphrite chronique. Cette protéine se différencie de l'Euglobuline $I_1$, car ces auteurs constatent qu'elle est soluble dans l'eau distillée (elle a donc un caractère pseudoglobulinique), insoluble dans les solutions diluées d'électrolytes, et solubles dans les solutions plus concentrées d'électrolytes et insoluble dans une solution contenant 23 p. 100 de ClNa ou 33 p. 100 de SO4(NH4) 2. C'est une $\gamma$ -globuline. Par conséquent, la cryoprotéine de Lerner se différencie de l'Euglobuline $I_1$ de Sandor principalement par sa solubilité dans l'eau distillée. Il est à signaler que dans un cas de même maladie G. Sandor a trouvé de l'Euglobuline $I_1$.

Barr et ses collaborateurs (24), en 1950, décrivent une cryoglobuline qu'ils identifient à celle de Lerner : même spectre d'absorption dans l'ultraviolet, même vitesse électrophorétique, même viscosité, même solubilité dans l'eau distillée. Donc, il s'agit non d'une $\gamma$ -euglobuline comme l'Euglobuline $I_1$ de Sandor, mais d'une pseudoglobuline, puisque soluble dans l'eau.

Bien que Barr la rapproche de la cryoglobuline qu'il décrit, plus proche de l'Euglobuline $I_1$, est la cryoprotéine précipitée, en 1938, par Von Bonsdorff. Cette

protéine sérique cristallise spontanément, quand le sérum est porté à une température de + 8°, et elle est relativement insoluble dans l'eau distillée (57).

Dans un cas de purpura hémoragique et syndrome de Raynaud, F. Delbarre, Harvier et Turiaf (58) constatent une cryoprotéinémie : par refroidissement, le plasma se prend en masse. Il s'agirait de macroglobulines hyperfloculables qu'on ne trouve jamais dans un sérum normal ; cette macroglobuline serait plus floculable que les $\gamma$ -globulines normales. L'électrophorèse du sérum de la malade donne un pic élevé des $\gamma$ -globulines et révèle la présence de globulines qui ont peu tendance à migrer et dont la majorité est plus lente que les $\gamma$ -globulines normales. Le taux de méthionine de cette macroglobuline est très bas ; il n'y a pas de sucre protidique ; le taux de cholestérol est proche de celui des $\gamma$ -globulines. Cette globuline de Delbarre et collaborateurs semble être très proche de l'Euglobuline $I_1$ de Sandor : comme celle-ci, c'est une $\gamma$ -globuline lente, visqueuse, cryoglobulinique et pauvre en méthionine. Nous ne savons pas si elle est euglobulinique, ces auteurs ne donnant pas sa solubilité dans l'eau distillée.

Nous voyons que parmi les globulines décrites, certaines (celles de Felton, de Von Bonsdorff, de Bierry, de Delbarre en particulier) ont des propriétés similaires à celles de l'Euglobuline $I_1$ de Sandor. Il aurait été intéressant de comparer toutes les propriétés et caractéristiques de ces différentes globulines, mais aucun de ces auteurs n'a donné une étude physique, chimique, biologique suffisamment complète de la protéine décrite pour permettre une telle comparaison.

# CONCLUSION

Le précipité protidique obtenu en abaissant la force ionique d'un sérum par dialyse ou par dilution dans l'eau distillée et en maintenant le pH à 7,4, porte le nom d'Euglobuline $I_1$. En pratique, cette Euglobuline $I_1$ est mise en évidence par la fiche réticulo-endothéliale de Sandor.

A. — Les *propriétés physiques* de l'Euglobuline $I_1$ sont les suivantes :

1° L'étude de la solubilité de l'Euglobuline $I_1$ en fonction du pH montre que cette protéine est insoluble entre pH 8 et pH 6 ; son point isoélectrique est élevé, voisin de 7.

2° L'Euglobuline $I_1$ est une $\gamma$ -globuline lente dont la vitesse électrophorétique est inférieure à celle des autres $\gamma$ -globulines.

3° L'Euglobuline $I_1$ est très peu soluble dans les solutions contenant du sulfate d'ammonium à 25 p. 100 de la saturation, et dans les solutions de phosphates de molarité égale à 1,4.

4° Les solutions d'Euglobuline $I_1$ sont peu modifiées par un chauffage prolongé à la température de 58° ; mais le même traitement appliqué à des sérums riches en Euglobuline $I_1$ fait disparaître cette protéine.

B. — *L'étude chimique* de l'Euglobuline $I_1$ porte sur les dosages des protéines, des lipides et des sucres.

1° Le taux de l'Euglobuline $I_1$ dans les sérums normaux n'excède pas 0,6 g p. 1.000. Ce taux peut atteindre 10 g dans certains états pathologiques.

2° Les lipides sériques entraînés dans les préparations de l'Euglobuline $I_1$ sont surtout constitués de grais-

ses neutres ; leur quantité est très faible (1 à 3 p. 100 du poids de l'Euglobuline $I_1$). La charge en lipides liés est pratiquement nulle.

3° L'Euglobuline $I_1$ contient très peu de « sucre protidique ».

4° L'Euglobuline $I_1$ apparaît particulièrement pauvre en méthionine.

C. — L'Euglobuline $I_1$ intervient dans de nombreuses *réactions biologiques :*

1° L'Euglobuline $I_1$ a les caractères d'une cryoglobuline.

2° L'Euglobuline $I_1$ est une agglutinine froide.

3° L'Euglobuline $I_1$ possède un pouvoir anticomplémentaire marqué, ce qui peut fausser les dosages de l'alexinémie.

4° L'Euglobuline $I_1$ est le support des anticorps dans certains sérums antimicrobiens.

5° L'Euglobuline $I_1$ joue un rôle déterminant dans la positivité de nombreuses réactions sériques non spécifiques (réactions de déséquilibre protidique).

D. — Les *propriétés physio-pathologiques* de l'Euglobuline $I_1$ sont bien connues ; elles peuvent s'énoncer ainsi :

1° L'Euglobuline $I_1$ provient vraisemblablement du tissu mésenchymateux et témoigne de l'activité de ce tissu. Elle existe en faible quantité dans tous les sérums, et augmente dans les maladies caractérisées par l'hyperplasie du système réticulo-endothélial.

2° Elle ne traverse pas le placenta.

3° Dans l'organisme vivant, l'Euglobuline $I_1$ semble intervenir en favorisant la macrophagie. Un excès de cette protéine est peut-être la cause de quelques signes morbides tels que l'anémie et certains accidents dus au froid.

# BIBLIOGRAPHIE


(1) Felton L.D. — Dissociation of the specific protein precipitate of antipneumococcus horse serum and a comparison with a protein isolated by chemical means from the immune serum. *J. Immun.*, 1932, *22*, 453.

(2) Sandor G. — Euglobuline $I_1$, entité physico-chimique et physiopathologique. *C.R. Acad. Sc.*, 1951, *232*, 2492.

(3) Sandor G. — Système globulinique du sérum et l'immunité. VII : Euglobuline $I_1$, entité physico-chimique et physio-pathologique. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1951, *33*, 1483.

(4) Vargues R. — Propriétés non spécifiques d'un sérum de cheval hyperimmunisé (antipesteux). Importance de l'Euglobuline $I_1$ de Sandor. *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, *83*, 423.

(5) Vargues R. et Schembri L. — Les réactions sériques non spécifiques et la fiche réticulo-endothéliale de Sandor. *Algérie Médicale*, 1954, *58*, 237.

(6) Vargues R. — Proposition d'une technique simplifiée pour l'établissement de la fiche réticulo-endothéliale de Sandor. *Algérie Médicale*, 1952, *56*, 99.

(7) Vargues R. et Fabiani G. — La fiche réticulo-endothéliale de Sandor (technique simplifiée) appliquée à l'étude de 300 sérums de malades. *Algérie Médicale*, 1952, *56*, 705.

(8) Guiraud A. — L'exploration des Euglobulines sériques au cours de l'état gravido-puerpéral par la fiche réticulo-endothéliale de Sandor (technique de Vargues R.). *Thèse Médecine Alger*, 1953.

(9) Lhéritier R. — Etude technique sur la fiche réticulo-endothéliale de Sandor. *Thèse Pharmacie Alger*, 1953.

(10) Schembri L. — Les réactions sériques non spécifiques. Mécanisme et comparaison avec la fiche réticulo-endothéliale de Sandor. *Thèse Pharmacie Alger*, 1953.

(11) Sandor G. — Immunité humorale. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1949, *31*, 623.

(12) Vargues R. et Sandor G. — Euglobuline III - $\alpha$ - lipoglobuline de caractères chimiques définis. *C.R. Acad. Sc.*, 1951, *233*, 1146.

(13) Sandor G. et De Mende S. — Système globulinique du sérum et l'immunité, VI : étude électrophorétique des euglobulines et quelques considérations concernant leur nature. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1950, *32*, 550.

(14) Chéchan C. — Perfectionnements apportés aux méthodes d'électrophorèse sur papier (à paraître).

(15) Sandor G. et Weill-Fage J.C. — « La fiche réticulo-endothéliale », méthode de diagnostic et de pronostic. *Bull. Acad. Nat. Médecine*, 1950, 800.

(16) Sandor G. et Weill-Fage J.C. — Un nouveau test de physiopathologie : la fiche réticulo-endothéliale. *Ann. Inst. Pasteur*, 1950, *79*, 130.

(17) Vargues R. — Etude des relations entre les lipides et les protides du sérum sanguin et nature des $\alpha$ et $\beta$ - globulines. *Thèse Sciences Paris*, 1951.

(18) Machebœuf M. — Etat des lipides de la matière vivante. Les cénapses et leur importance biologique. *Paris*, 1937, Hermann.

(19) Sorensen et Haugaard. — *C.R. Lab. Carlsberg*, 1953, *19*, N° 12.

(20) Sandor G., Mlle Sabetay et Vargues R. — Le système des globulines peu solubles du sérum. I : Etude de quelques relations entre les lipides et les protéides dans les sérums sanguins. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1953, *35*, 273.

(21) Blix, Tiselius et Svensson. — Lipids and polysaccharids in electrophoratically separed blood serum protein. *J. Biol. Chem.*, 1941, *137*, 485.

(22) Lerner A.B. et Watson C.J. — Studies of cryoglobulins. I : Unusual purpura associated with the presence of a high concentration of cryoglobulins (cold pricipitable serum protein). *Am. J. Med. Sc.*, 1947, *214*, 410.

(23) Ravina A. — La cryoglobulinémie. *Presse Médicale*, 1951, *59*, 1595.

(24) Barr D.P., Reader G.G. et Wheeler C.H. — Cryoglobulinemia. I. : Report of two cases with discussion of clinical manifestation, incidence and signification. *Ann. Intern. Med.*, 1950, *32*, 6.

(25) Delbarre F. — Les méthodes modernes d'analyse des constituants azotés de l'organisme : électrophorèse et chromatographie. in. La masse azotée de l'organisme humain et les variations pathologiques. (Rapports présentés au *XXIX^e Congrès Français de Médecine, Paris*, 1953.

(26) Sandor G. et Mlle Skrobisz C. — Euglobulines et agglutinines. *Ann. Inst. Pasteur*, 1948, *75*, 532.

(27) Ramsay H. et Scadding J.G. — *Quart. J. Med.*, 1939, *8*, 72.

(28) Petterson O.L., Ham T.H., Finlande M. *Science*, 1943, *97*, 167.

(29) Rose. — *Proceedings of the Soc. Exp. Biol. and Med.*, 1945, *58*, 98.

(30) *a*) Eyquem A. — Les agglutinines froides. Leur signification clinique. Leur importance biologique dans les pneumonies atypiques primitives à virus. *Semaine des Hôpitaux de Paris*, 1950, *52*

(30) *b*) Eyquem A. — Les agglutinines froides ou cryo-agglutinines *Gaz.. Méd. de France*, 1954, *61*, 557.

(30) *c*) Eyquen A., Cateigne et Harmann U. — Diagnostic biologique de Pneumonies à virus. *Ann. Biol. Chim.*, 1950, *8*, 539.

(31) Dacie J.V. — The presence of cold hemolysins in sera containing cold haemagglutins. *J. Path. Bact*, 1950, *62*, 241.

(32) Benhamou E., Zermati M. et Assus A. — Les agglutinines froides. *Ann. de Med.*, 1948, *49*, 499.

(33) Assus A. — Etude sur les agglutinines froides. *Thèse Médecine*, Alger, 1948.

(34) Zermati M. et Vargues R. — Etude biologique électrophorétique et expérimentale d'une pan-agglutinine froide. *Congrès de Transfusion, Alger*, 1953.

(35) Gutman A.B. — The plasma proteins in disease. *Advances in Protein Chemestry*, 1948, *4*, 156.

(36) Davis B.B., Kabat E.A., Harris A. et Moore D.H. *J. Immunol.*, 1949, *49*, 223.

(37) Gutman A.B. et Williams R.D. — *J. Clin, Invest.*, 1936, *15*, 458.

(38) Ranque J. — Contribution à l'étude de l'alexine. *Thèse Médecine*, Marseille, 1942.

(39) Vargues R. — Etude de l'alexinémie au cours des maladies infectieuses humaines. *Thèse Médecine*, Alger, 1947.

(40) Pillemer, Ecker, Oncley et Cohn. — Préparation et caractère physico-chimique des composants sériques protidiques du sérum. *Jl. of Exp. Med.*, 1941, *74*, 297.

(41) Sandor G. — Systèmes globuliniques du sérum et l'immunité. III : Nature des agglutinines contenues dans les sérums d'hommes atteints de fièvre typhoïde. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1949, *31*, 706.

(42) Vargues R. — Rôle de l'Euglobuline $I_1$ de Sandor dans le mécanisme de la réaction de Mac Lagan. *C.R. Soc. Biol.* 1953, *147*, 110.

(43) Vargues R. et Schembri L. — L'Euglobuline $I_1$ de Sandor, facteur de positivité de la réaction de Hanger. *Soc. Biologie, Alger*, 1954.

(44) Bordet J. et Gay P. — L'absorption de l'alexine et le pouvoir antagoniste des sérums normaux. *Ann. Inst. Pasteur,* 1908, *22,* 625.

(45) Vargues R. — Etude des modifications de la fiche réticulo-endothéliale du tracé électrophorétique chez des rats soumis à des injections de cortisone. *Soc. Biol. Alger,* 1954.

(46) Wesley I. et Sandor, G. — L'influence du blocage du système réticulo-endothélial sur la fiche réticulo-endothéliale. *C.R. Acad. Sciences,* 1952, *235,* 1159.

(47) Vargues R. — Démonstration chimique de l'action anti-inflammatoire de la cortisone : inhibition de la production de l'Euglobuline $I_1$ de Sandor. *C.R. Acad. Sciences,* 1952, *235,* 838.

(48) Hadjeres S. — Contribution à l'étude anatomo-pathologique du paludisme expérimental à *Plasmodium berghei. Thèse Médecine,* Alger, 1954.

(49) Laffont A., Vargues R., Assus A. et Guiraud A. — Les euglobulines de la femme enceinte et du nouveau-né par la fiche réticulo-endothéliale. *Gynécologie et Obstétrique,* 1953, *52,* 279.

(50) Doladilhe M. — Sur la dissociation de la globuline en deux constituants : la protéine visqueuse et l'homoglobuline. *C.R. Soc. Biol.,* 1937, *125,* 409.

(51) Hewitt L.F. — *Biochem. J.,* 1938, *32,* 1540.

(52) Green, Mc Khann, Kapnick et Fahey. *J. Immun.,* 1939, *36,* 245.

(53) Green. — *J. Amer. Chem. Soc.,* 1938, *60,* 1008.

(54) Kabat. — *J. Exper. Med.,* 1939, *69,* 103.

(55) Bierry H. — *Bull. Soc. Chim. Biol.,* 1942, *24,* 1027.

(56) Lerner A.B., Greenberg G.R. — A homomolecular serum protein with anomalous solubilities. *J. Biol. Chem.,* 1946, *162,* 429.

(57) Von Bonsdorff B., Groth H., et Packalen Th. — On the presence of high molecular crystallizable protein in blood serum in myeloma. *Folia Hematol.,* 1938, *59,* 184.

(58) *a*) Harvier P., Turiaf J. et Delbarre F. — Purpura hemorragique, syndrome de Raynaud et cryoprotéinémie. *Presse Médicale,* 1953, *61,* 1549.

(58) *b*) Polonovski M. et Delbarre F. — Etude chimique de la protéine de Bence Jones. Recherche et dosage de la méthionine. *Bull. Soc. Chim. Biol.,* 1950, *32,* 382.

Le Président du jury :

G. FABIANI.

Vu : le Doyen,

Ch. SARROUY.

Vu et permis d'imprimer,

Alger le 28 mai 1954.

Le Recteur,

GAU.